

UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Farmacia



Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico

Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di laurea

**Caratterizzazione tecnologica di inserti
oftalmici preparati mediante tecniche di
estrusione per la somministrazione
intravitreale di fluocinolone acetoneide**

Relatore

Prof.ssa Patrizia Chetoni

Correlatore

Dott.ssa Silvia Tampucci

Candidata

Elena Giusti

Anno Accademico 2013/2014

Ai miei nonni

Riassunto

Tradizionalmente la somministrazione oculare di farmaci viene realizzata per via topica, mediante colliri o pomate oftalmiche, o, più raramente, per via sistemica. Tuttavia entrambe le strategie risultano piuttosto inefficaci quando la patologia coinvolge la camera posteriore dell'occhio, data la complessità della struttura anatomica e fisiologica che offre un'altissima protezione delle strutture oculari profonde agli xenobiotici, ivi compresi i farmaci.

La somministrazione topica dei farmaci infatti, è molto efficace per i disordini della superficie oculare e della camera anteriore, mentre risulta inappropriata per la cura di patologie della camera posteriore, a causa della presenza di barriere anatomiche e fisiologiche e della scarsa capacità delle molecole di farmaco di diffondere fino al loro sito d'azione, quale ad esempio, la retina.

Negli ultimi anni la ricerca tecnologica si è concentrata sullo studio di metodi innovativi per la somministrazione dei farmaci ai tessuti oculari e gli sforzi si sono concretizzati nella messa a punto di forme solide (impianti o inserti) da applicare, principalmente per via chirurgica, nella sclera o nel corpo vitreo. Affinchè questi dispositivi siano efficaci ed applicabili sull'uomo è necessaria un'approfondita valutazione delle loro caratteristiche tecnologiche.

La presente tesi ha avuto come fine la messa a punto di un inserto oculare per il rilascio di fluocinolone acetone nella camera vitreale dell'occhio. Lo studio si è concentrato, nella prima fase, sulla preparazione di un sostituto artificiale dell'umor vitreo, ritenuto utile per la caratterizzazione degli inserti polimerici.

In particolare sono state confrontate le caratteristiche viscoelastiche di diversi idrogeli costituiti da 1) alcool polivinilico reticolato e acido ialuronico e 2) agar e acido ialuronico in diverse concentrazioni e rapporti tra i componenti.

In un secondo momento l'attenzione si è concentrata sulla valutazione delle caratteristiche tecnologiche di una serie di inserti, forniti dal gruppo di ricerca di Tecnologia Farmaceutica del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Milano, preparati utilizzando tecniche di estrusione, relativamente al 1) profilo di rigonfiamento, 2) dissoluzione degli inserti e 3) velocità di rilascio in vitro del principio attivo, allo scopo di individuare l'inserto più adatto per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato. Il comportamento degli inserti è stato analizzato utilizzando sia tampone Sørensen fosfato isotonic pH=7,4 che umor vitreo artificiale a diverse temperature.

In conclusione, il sistema HF-FLUO non possiede le ideali caratteristiche di rilascio del farmaco che ci eravamo prefissati di ottenere, anche se si può considerare positivo aver individuato una tecnologia di produzione applicabile allo scopo (estrusione), dei materiali che potrebbero essere una base da cui partire per lo sviluppo di altre tipologie di inserti oftalmici e un modello sperimentale di umore vitreo utile per ulteriori approfondimenti.

Indice

I. PARTE INTRODUTTIVA	1
1. ANATOMIA DELL' APPARATO VISIVO	2
1.1 STRATO ESTERNO DELL'OCCHIO: LA TONACA FIBROSA	3
1.2 LO STRATO INTERMEDIO DELL'OCCHIO: TONACA VASCOLARE	4
1.3 LO STRATO INTERNO DELL'OCCHIO: LA RETINA	5
1.4 MEZZI DI RIFRAZIONE DELL'OCCHIO	7
1.5 COMPONENTI NERVOSE EXTRAOCULARI	8
1.6 ANNESSI OCULARI	8
2. INNOVAZIONI NEL DRUG DELIVERY OCULARE	10
2.1 STRATEGIE CONVENZIONALI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI NELLA CAMERA POSTERIORE DELL'OCCHIO	10
2.2 STRATEGIE INNOVATIVE PER LA SOMMINISTRAZIONE OFTALMICA DEI FARMACI: GLI INSERTI OCULARI	11
2.3 INSERTI A BASE DI POLIMERI NON BIODEGRADABILI	12
2.4 INSERTI A BASE DIPOLIMERI BIODEGRADABILI	16
II. PARTE SPERIMENTALE	20
3. SCOPO DELLA TESI	21
4. METODI	22
4.1 MATERIALI	22
4.2 MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI VITREO ARTIFICIALE	22
4.2.1 Preparazione di un idrogel sostituto dell'umor vitreo a base di alcool polivinilico e acido ialuronico	22
4.2.2 Preparazione di un idrogel sostituto del l'umor vitreo a base agar e acido ialuronico	23
4.3 CARATTERIZZAZIONE REOLOGICA DEGLI IDROGELI	24
4.4 PREPARAZIONE DEGLI INSERTI	25
4.5 VELOCITÀ DI DISSOLUZIONE DEGLI INSERTI	25
4.6 RILASCIO IN VITRO DEL FLUOCINOLONE ACETONIDE	26

4.6.1 Rilascio in vitro del fluocinolone acetonide dall'inserto HF-FLUO in tampone fosfato mediante metodo del cestello rotante.....	26
4.6.2 Rilascio del fluocinolone dall'inserto HF-FLUO in idrogel di agar.....	26
4.7 ANALISI QUANTITATIVA DEL FLUOCINOLONE ACETONIDE MEDIANTE HPLC	27
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	29
6. TABELLE	344
7. GRAFICI.....	42
8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	56

I. PARTE INTRODUTTIVA

1. ANATOMIA DELL' APPARATO VISIVO

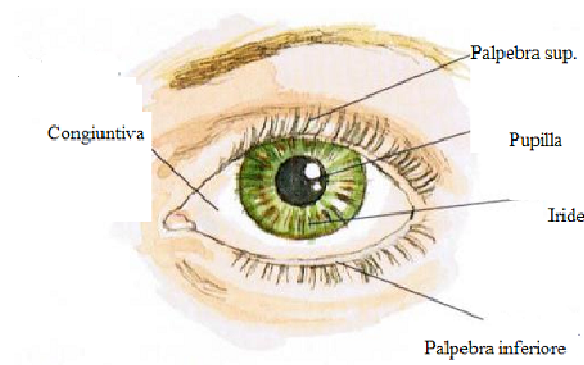


Figura 1.1 l'occhio umano

L'apparato visivo è composto dal bulbo oculare, dagli annessi oculari e dal nervo ottico. Ne fanno parte, inoltre, l'orbita e le vie ottiche. L'organo principale è l'occhio, un organo di senso pari e simmetrico, a cui è affidato il compito di raccogliere la luce dall'ambiente circostante, di regolarne l'intensità mediante contrazione dell'iride, e di focalizzarla formando un'immagine su una membrana fotosensibile chiamata retina. A questo livello la luce viene convertita in un segnale elettrico inviato poi a specifiche aree corticali e sottocorticali per l'elaborazione.

L'occhio (Fig. 1.1.) è situato nella regione anteriore della testa, all'interno della cavità orbitale, una cavità ossea a forma di piramide scavata all'interno del massiccio facciale, a cui è collegato da sei muscoli estrinseci.

Il bulbo oculare risulta costituito da tre membrane concentriche: la più esterna, formata dall'unione di sclera e cornea, dall'uvea e dalla retina, che riveste internamente il bulbo oculare.

All'interno del globo (Fig. 1.2) si trovano i mezzi di rifrazione dell'occhio, che dividono il volume interno in tre camere separate, la camera anteriore, tra la faccia posteriore della cornea e quella anteriore dell'iride, la camera posteriore, delimitata in avanti dalla faccia posteriore dell'iride, posteriormente dal legamento sospenditore del cristallino e lateralmente dai processi ciliari. Infine lo spazio compreso tra la faccia posteriore del cristallino e la retina prende il nome di camera vitrea.

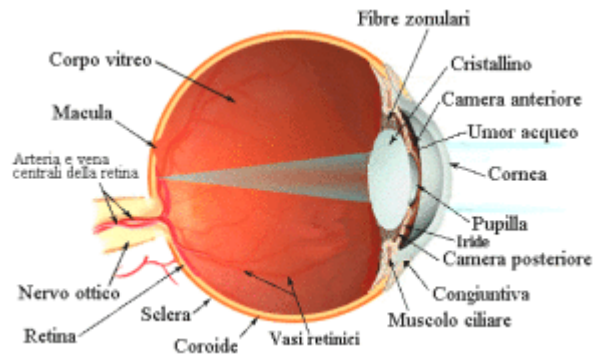


Figura 1.2 Anatomia dell'occhio

1.1 STRATO ESTERNO DELL'OCCHIO: LA TONACA FIBROSA

La tonaca fibrosa è composta da sclera e cornea.

La sclera è la membrana che riveste esternamente il bulbo oculare ed il suo compito principale consiste nel proteggere le strutture più interne dell'occhio, mantenerne la corretta forma e controbilanciare la pressione esercitata dai fluidi intraoculari. Essa copre il 93% della superficie oculare ed è costituita da uno strato superficiale fibroso, chiamato lamina episclerale, che si trova a contatto con la congiuntiva, al di sotto del quale si identifica lo stroma sclerale (che anteriormente si continua in quello corneale), costituito prevalentemente da fibre collagene, immerse in una matrice di proteoglicani, unite a fibroblasti e fibre elastiche. La struttura disordinata delle fibre di collagene, la variabilità del loro diametro e le loro numerose ramificazioni, se da un lato rendono il tessuto opaco alla luce, dall'altro gli conferiscono la sua caratteristica resistenza meccanica.

Sulla superficie della sclera si osservano molti fori che permettono il passaggio di rami arteriosi, venosi e nervosi diretti alle strutture più profonde del globo oculare. In particolare la zona posteriore è attraversata dal nervo ottico e vi si individuano le inserzioni dei muscoli (<http://www.soiweb.com>).

La cornea è la porzione trasparente della membrana fibrosa che completa la porzione mancante di sclera chiudendo anteriormente il bulbo oculare. La faccia esterna (convessa) è in contatto con l'esterno, quella posteriore invece è bagnata dall'umor acqueo e contribuisce a delimitare la camera anteriore.

Dal punto di vista istologico si riconoscono cinque diversi strati:

- *l'epitelio*: è lo strato più esterno, si trova a contatto con il film lacrimale e risulta costituito da 7 strati di cellule piatte all'esterno che poi si trasformano in cellule poliedriche, fino a diventare, negli strati più profondi, cellule cubiche. (<http://www.soiweb.com>)

- *la membrana di Bowman*: è uno strato estremamente sottile che segna il confine tra epitelio e stroma ed è composto prevalentemente da fibre collagene addensate, che non sono altro che propaggini delle fibrille collagene dello stroma;

- *lo stroma* è lo strato più spesso (500 μm , 9/10 del totale) ed è costituito da cheratociti, cellule appiattite simili ai fibroblasti, disposti parallelamente alla superficie della cornea. Intorno alle cellule si trova una rete di fibrille di collagene, le quali hanno sezione circolare e uguale diametro. Esse sono organizzate in modo da trovarsi parallele le une alle altre ed equidistanti tra loro per formare strutture più grandi chiamate lamelle; le lamelle a loro volta si dispongono parallele tra loro in uno strato di 1-2 μm . Le cellule e le lamelle sono immerse in una sostanza fondamentale a base di mucopolisaccaridi, che si ritiene prodotta dai cheratociti. La struttura estremamente ordinata riscontrata in questo tessuto è alla base della trasparenza della cornea.

- *la membrana di Descemet (o limitante posteriore)* è uno strato spesso 5-10 μm , privo di cellule, costituito da fibrille di collagene, che rappresenta la membrana basale dell'endotelio corneale.

- *l'endotelio corneale* è lo strato più interno, si trova in contatto con l'umor acqueo ed è formato da un unico strato di cellule appiattite di forma esagonale, disposte a mosaico, il cui numero e densità tende a diminuire con l'età.

La caratteristica più importante della cornea è la trasparenza, che si realizza grazie alla sostanziale avascolarità della cornea, alla particolare struttura dello stroma e al corretto ricambio di fluidi nel tessuto. Inoltre, tra le sue caratteristiche dobbiamo menzionare anche la specularità (la riflessione della luce sulla superficie) e la permeabilità, essenziale per lo scambio salino (<http://www.soiweb.com>).

1.2 LO STRATO INTERMEDIO DELL'OCCHIO: TONACA VASCOLARE

La tonaca vascolare, chiamata anche uvea, si trova interposta tra la sclera e la retina e si distingue in tre sezioni:

L'iride è la parte più anteriore, di forma anulare, perforata al centro dal foro pupillare, il cui diametro può variare grazie all'azione dei muscoli costrittore e dilatatore della pupilla. Si trova dietro la cornea, ma non aderisce a essa (delimitando così la camera anteriore), mentre posteriormente è praticamente a contatto con il cristallino. Il tessuto che lo compone è spugnoso, facilmente lacerabile e pigmentato. La zona in cui iride e cornea entrano in contatto prende il nome di angolo irido-corneale, all'interno di questa zona si trovano canali e strutture (canale di Schlemm, trasecolato etc) attraverso le quali defluisce l'umor acqueo prodotto dai corpi ciliari, risultando così cruciale nella patogenesi del glaucoma (Carbone et Al. 2008; <http://www.soiweb.com>).

Il corpo ciliare, addossato alla sclera, ha forma anulare e separa l'iride dalla coroide. Risulta diviso in due zone: la *pars plana*, una porzione discoidale che tramite l'ora serrata confina con la sclera, e la *pars plicata*, compresa tra l'iride e la *pars plana*. Le funzioni principali del corpo ciliare sono l'assorbimento della luce indiretta, la secrezione di umor acqueo da parte dello strato esterno, il mantenimento in sede del cristallino (attraverso filamenti che si inseriscono sul processo ciliare e ne costituiscono l'apparato sospenditore) e l'accomodazione di quest'ultimo.

Il corpo ciliare è composto da cinque strati, più internamente troviamo due strati epiteliali, uno non pigmentato responsabile della secrezione di umor acqueo, l'altro pigmentato necessario per l'assorbimento della luce indiretta. Oltre troviamo lo stroma, in cui decorrono, immersi in una matrice di collagene, nervi e vasi sanguigni. I capillari presenti nello stroma risultano fenestrati in modo da facilitare la fuoriuscita di determinate molecole importanti nella produzione di umor acqueo. Infine il muscolo ciliare, responsabile dell'accomodazione del cristallino, risulta separato dalla sclera dall'ultimo strato che prende il nome di lamina sopraciliare, ricca di fibre collagene (<http://www.soiweb.com>).

La coroide è una membrana costituita da quattro strati di connettivo lasso fortemente vascolarizzato che tappezza la parte posteriore dell'occhio, sul davanti si continua con il corpo ciliare, da cui è separata dall'ora serrata, mentre nella parte posteriore si riconosce il foro d'uscita del nervo ottico. È di colore scuro a causa dei pigmenti che contiene e dei numerosi vasi che la attraversano e che garantiscono nutrimento alla retina a cui aderisce tramite la faccia interna, mentre quella esterna è connessa con la sclera (<http://www.soiweb.com>).

1.3 LO STRATO INTERNO DELL'OCCHIO: LA RETINA

La membrana più interna dell'occhio prende il nome di retina e costituisce la principale componente nervosa dell'occhio; ha il compito di trasmettere al nervo ottico il segnale elettrico in cui ha convertito l'immagine ricevuta dai mezzi di rifrazione. La retina ricopre senza interruzione tutto lo strato interno della tonaca vascolare e vi si possono riconoscere due sezioni, il cui confine viene segnato dall'ora serrata: posteriormente la parte ottica, che espleta la funzione visiva e nasce in corrispondenza dell'emergenza del nervo ottico, anteriormente la parte cieca che termina in corrispondenza del foro pupillare. Nella struttura della retina si distinguono due strati, uno esterno, detto pigmentario, e uno strato nervoso, chiamato foglietto interno o retina propriamente detta, che contiene uno strato di fotorecettori (coni e bastoncelli della retina).

Nella parte posteriore della retina si trova la papilla del nervo ottico, da cui si dipartono nervi e vasi diretti a tutto il globo oculare; lateralmente si riconosce una

zona di forma ellittica chiamata *macula lutea* che contiene una depressione che prende il nome di *fovea centralis*, caratterizzata da un'altissima concentrazione di fotorecettori e pertanto sede della visione diurna e dei colori. (<http://www.soiweb.com>).

1.4 MEZZI DI RIFRAZIONE DELL'OCCHIO

L'umor acqueo viene prodotto dall'epitelio del corpo ciliare, fluisce nella camera anteriore attraverso il foro pupillare e da qui viene allontanato tramite varie strutture (maglie del trabecolato corneo-sclerale, canale di Schlemm) localizzate nell'angolo corneale. L'equilibrio tra produzione e drenaggio determina la pressione intraoculare, che normalmente si attesta sui 16mmHg.

La produzione avviene grazie a un processo di filtrazione attraverso i capillari, coadiuvata da meccanismi di trasporto attivo; si forma così una soluzione di composizione molto simile a quella del plasma, ma priva di proteine.

L'umor acqueo ha funzione trofica nei confronti delle strutture avascolari con cui è in contatto, in particolare nei confronti della cornea, del cristallino, dell'umor vitreo, a cui fornisce principalmente ossigeno e glucosio (Carbone et Al. 2008).

Il cristallino è una struttura trasparente che si ritrova nella camera posteriore dell'occhio; ha la forma di una lente biconvessa con diversi raggi di curvatura, essendo la faccia posteriore più convessa di quella anteriore. Il diametro misura circa 10 mm e lo spessore è compreso tra i 3.6 –4.0 mm.

Il cristallino è tenuto in sito da un complesso sistema di fibre collegate con le pareti dell'occhio che hanno la capacità di farne variare il raggio di curvatura, dando così luogo al fenomeno dell'accomodazione, che permette la messa a fuoco delle immagini sulla retina. Il cristallino è trasparente, privo di nervi e vasi sanguigni e trae il suo nutrimento unicamente dall'umor acqueo; risulta composto in gran parte da fibre anucleate, racchiuse da un epitelio e da una capsula esterna chiamata cristalloide (<http://www.soiweb.com>).

Il corpo vitreo è un gel che occupa interamente la camera vitrea, ossia riempie lo spazio compreso tra la faccia posteriore del cristallino e la retina. È una sostanza trasparente, di consistenza gelatinosa che pesa circa 4.0 g, ha una densità di 1,0053-1,0089 g/cm³, un indice di rifrazione di 1,3345-1,3348 e un pH compreso tra 7,0 e 7,4 (Baino, 2010). Il 99% del peso è costituito da acqua, la restante parte da fasci incrociati di sottili fibre di collagene, che costruiscono un'impalcatura che conferisce rigidità al sistema; negli spazi liberi della struttura rigida si trovano molecole di acido ialuronico, un glicosamminoglicano che dona elasticità alla struttura permettendo l'assorbimento degli shock meccanici che l'occhio potrebbe subire. Contiene inoltre, alcune cellule, prevalentemente fibroblasti e ialociti.

Il corpo vitreo protegge le strutture circostanti dai traumi meccanici, permette la circolazione dei nutrienti attraverso l'occhio, regola l'ossigenazione, contribuisce a mantenere la forma del globo oculare e mantiene in posizione retina e cristallino (Baino, 2010; <http://www.soiweb.com>)

1.5 COMPONENTI NERVOSE EXTRAOCULARI

Il **nervo ottico** è il secondo delle dodici paia di nervi cranici, ma, a differenza degli altri, le sue fibre sono ricoperte di mielina e sono avvolte nelle tre meningi, per questa ragione il nervo ottico può essere considerato una continuazione del sistema nervoso centrale. È lungo 3,5-5,5 cm ed ha uno spessore di circa 3,0 mm; come già detto è avvolto dalle meningi, all'interno delle quali decorrono anche l'arteria e la vena centrale. Esso nasce all'interno del bulbo oculare (papilla ottica), esce dall'orbita ed entra nel canale ottico per raggiungere così l'interno del cranio. In dettaglio il nervo ottico è composto da assoni che nascono dalle cellule gangliari della retina, percorrono tutto il nervo, subiscono parziale decussazione nel chiasma ottico ed infine terminano nel diencefalo, in particolare nel corpo genicolato laterale, da cui le informazioni vengono poi trasferite alla corteccia visiva (<http://www.soiweb.com>).

1.6 ANNESSI OCULARI

Le **sopracciglia** rappresentano quella zona di cute rivestita di peli che si trova in corrispondenza del margine superiore dell'orbita oculare.

Le **palpebre** sono due pliche cutanee, una superiore ed una inferiore, che chiudono anteriormente l'orbita ed il bulbo oculare. La porzione terminale dove si trovano le ciglia (che servono a proteggere l'occhio da sudore e da microrganismi), prende il nome di bordo libero; le palpebre propriamente dette invece si estendono dalle ciglia superiori all'arcata sopracciliare e dalle ciglia inferiori all'arcata zigomatica.

L'**apparato lacrimale** è costituito dalla ghiandola lacrimale principale, dalle ghiandole accessorie, dal sistema escretore e dal film lacrimale. La sua funzione è quella di secernere la parte acquosa del film lacrimale.

Il **film lacrimale** è un fluido lievemente alcalino composto per la maggior parte da acqua (99%) e per la restante parte da proteine, sali minerali, mucopolisaccaridi, enzimi, ioni e zuccheri (1%). Mantiene continuamente bagnato il bordo libero delle palpebre, l'epitelio corneale e quello congiuntivale, provvedendo alla loro lubrificazione e nutrizione; inoltre contribuisce al potere refrattivo dell'occhio e svolge una funzione antibatterica. Il film lacrimale viene prodotto dalla ghiandola lacrimale principale, dalle ghiandole lacrimali accessorie e dalle secrezioni delle ghiandole palpebrali e congiuntivali (<http://www.soiweb.com>).

La congiuntiva è la membrana mucosa che riveste sia la faccia posteriore della palpebra superiore ed inferiore, sia la parte anteriore del bulbo oculare a formare una sorta di sacco, il sacco congiuntivale, che è aperto in avanti in corrispondenza della rima palpebrale.

2. INNOVAZIONI NEL DRUG DELIVERY OCULARE

2.1 STRATEGIE CONVENZIONALI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI NELLA CAMERA POSTERIORE DELL'OCCHIO

Tradizionalmente la somministrazione oculare di farmaci viene realizzata principalmente per via topica, mediante colliri o pomate oftalmiche, o, più raramente, per via sistemica. Tuttavia entrambe le strategie risultano piuttosto inefficaci quando la patologia coinvolge la camera posteriore dell'occhio, data la complessità della struttura anatomica e fisiologica che offre un'altissima protezione delle strutture oculari profonde dagli xenobiotici, ivi compresi i farmaci.

La somministrazione topica dei farmaci infatti, è molto efficace per i disordini della superficie oculare e della camera anteriore, mentre risulta inappropriata per la cura di patologie della camera posteriore a causa della presenza di barriere anatomiche e fisiologiche quali l'epitelio corneale ed il turnover lacrimale. Inoltre, l'efficacia è ostacolata dall'elevata distanza che la molecola di farmaco deve percorrere per diffusione prima di arrivare al suo sito d'azione quale, ad esempio, la retina. (Kompella et Al, 2011)

Parallelamente la somministrazione sistemica viene resa inefficace dalle barriere emato-acquosa e emato-retinica che regolano e limitano fortemente gli scambi con il circolo sistemico. Di conseguenza, per ottenere una concentrazione intravitreale di farmaco significativa dal punto di vista terapeutico, ci si trova costretti a somministrare dosi elevate che possono risultare tossiche a livello sistemico.

La strategia più immediata per ovviare a tali ostacoli è l'iniezione intraoculare, che, d'altra parte, presenta altri tipi di controindicazioni. Farmaci a basso peso molecolare come i corticosteroidi, presentano un'emivita troppo breve (2-6 ore) che richiederebbe iniezioni troppo frequenti per mantenere una adeguata concentrazione terapeutica, mentre molecole a alto peso molecolare come anticorpi o fattori di crescita endoteliali, hanno una lunga emivita ma necessitano comunque di iniezioni con cadenza almeno mensile.

Con l'aumentare della frequenza delle iniezioni incrementa anche il rischio di gravi effetti avversi, sia a carico della camera posteriore, come endoftalmiti, distacco della retina ed emorragie intravitreali, sia riguardanti la camera anteriore, ad esempio cataratta ed aumento della pressione intraoculare (Kompella et Al, 2011).

2.2 STRATEGIE INNOVATIVE PER LA SOMMINISTRAZIONE OFTALMICA DEI FARMACI: GLI INSERTI OCULARI

Negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sullo studio di metodi innovativi per la somministrazione dei farmaci ai tessuti oculari e gli sforzi si sono concretizzati nella messa a punto di forme solide (impianti o inserti) da applicare, principalmente per via chirurgica, nella sclera o nel corpo vitreo. Molte e varie sono le caratteristiche richieste a questi dispositivi perché siano efficaci ed applicabili sull'uomo.

Il primo aspetto da considerare è la capacità dell'impianto di veicolare il farmaco al bersaglio intraoculare prescelto, minimizzando gli effetti sistemici.

La quantità di farmaco rilasciata nell'unità di tempo dal sistema solido oftalmico (impianto o inserto) allo stato stazionario deve essere adeguata alle necessità terapeutiche, deve mantenersi cioè nel *range* terapeutico per tutto il tempo desiderato senza variazioni significative di concentrazione. Inoltre, il rilascio deve essere controllato, ossia la degradazione del carrier polimerico e/o il rilascio da questo, devono avere una velocità ben definita e questa deve mantenersi stabile per mesi o anni.

Questo approccio permette di ridurre al minimo i trattamenti necessari per la cura di malattie croniche, dato che le procedure tradizionali, pur ottimizzate, presentano notevoli rischi di complicazioni.

Il dispositivo deve resistere a eventuali stress meccanici senza deteriorarsi o deformarsi; il materiale di cui è composto deve essere compatibile sia con l'ambiente biologico, sia con il farmaco che deve veicolare, e non influenzare la stabilità chimica di quest'ultimo. Questo approccio permette di evitare vantaggiosamente gli effetti collaterali connessi con le altre strategie terapeutiche, in particolare quelli legati alle frequenti iniezioni intravitreali, agli elevati picchi di concentrazione del farmaco causati dalla somministrazione "pulsata" ed agli effetti sistemici.

Si deve sottolineare inoltre che i costi sostenuti per la cura dei pazienti affetti da patologie intracamerale con sistemi solidi oftalmici risultano potenzialmente minori e la compliance dei pazienti maggiore grazie al prolungato tempo che intercorre tra i trattamenti consecutivi. (Kompella et Al, 2011)

Gli inserti oculari si distinguono in due grandi gruppi, in base alla loro capacità di degradarsi nell'ambiente biologico. In seguito si descriveranno le caratteristiche di questi due gruppi più in particolare, insieme a una panoramica degli inserti in commercio o in fase di sperimentazione, con particolare riguardo a quelli contenenti fluocinolone acetone o a base di HPC.

2.3 INSERTI A BASE DI POLIMERI NON BIODEGRADABILI

Gli inserti costituiti da polimeri non biodegradabili possono essere sostanzialmente di due tipi diversi che differiscono per la struttura, e, di conseguenza, per la modalità di rilascio del farmaco.

Nel “tipo riserva” il farmaco si trova concentrato in un *core* ricoperto da una membrana semipermeabile. Il polimero più comune in questo caso è l’etilenvinil acetato (EVA) ed il rilascio avviene grazie all’acqua che penetra attraverso la membrana e dissolve parzialmente il farmaco, che può diffondere così all’esterno del sistema. La velocità di rilascio del farmaco è controllata dalla membrana semipermeabile, ed è auspicabile che allo stato stazionario la cinetica di rilascio sia di ordine zero. Esiste un’altra versione di impianto “tipo riserva” in cui la membrana che ricopre la matrice è impermeabile ma dotata di un’apertura di grandezza predeterminata che controlla la quantità di farmaco che viene rilasciato.

Nel “tipo impianto” il polimero non biodegradabile contiene particelle di farmaco disperse in tutto il volume del dispositivo. I fluidi fisiologici penetrano all’interno del dispositivo, dissolvono il farmaco e lo trasportano all’esterno per diffusione.

Gli inserti non biodegradabili presentano alcuni inconvenienti; spesso infatti, per il posizionamento e l’ancoraggio a livello della camera vitreale sono necessarie incisioni e punti di sutura. Inoltre il rilascio di farmaco, in genere, diminuisce col tempo e possono essere necessari impianti aggiuntivi per mantenere la concentrazione del farmaco a livelli efficaci.

In seguito si descrivono i principali inserti oculari a base di polimeri non biodegradabili messi a punto fino ad oggi.

Retisert® (Bausch&Lomb, Inc., Rochester, NY/pSivida Ltd.) è un impianto solido di forma discoidale (3x2x5 mm) formato da una matrice a base di fluocinolone rivestita di PVA e silicone che viene impiantato nella sclera per via chirurgica mediante una incisione di 3 o 4 mm. Alla matrice è attaccata una linguetta di silicone lunga circa 5 mm che viene usata per fissare il dispositivo in prossimità del corpo ciliare tramite un punto di sutura.

La velocità di rilascio iniziale è di 0,6 µg/die, in seguito diminuisce e si mantiene costante per circa 30 mesi a valori intorno a 0,3-0,4 µg/die.

Nell’Aprile del 2005, il dispositivo è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) esclusivamente per la cura di uveiti croniche non infettive; tuttavia durante la Fase 3 della sperimentazione su pazienti affetti da edema maculare diabetico l’impianto, pur dimostrandosi efficace, ha fatto registrare un’altissima incidenza di cataratta (95%) e un aumento della pressione intraoculare (35%), per cui ne è stato sconsigliato l’uso per trattamenti di lungo periodo.

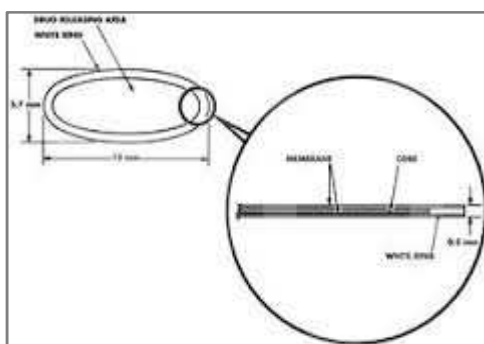


Figura 2.1 schema di un impianto Ocusert®



Figura 2.2 posizionamento di un impianto Ocusert®

Ocusert® (Alza corp.) è un impianto di tipo matrice messo a punto negli anni '70 per la cura del glaucoma, che ha rappresentato una grandissima innovazione nel settore del drug delivery oculare. La riserva di pilocarpina dispersa in acido alginico ha forma discoidale ed è racchiusa da due foglietti di EVA che costituiscono la membrana semipermeabile, il sistema è chiuso ai lati da un anello che agevola il posizionamento.

L'inserto, che misura 13,4 x 5,7 x 0,3 mm, viene posizionato nel fornice congiuntivale inferiore una volta alla settimana ed è disponibile in due dosaggi: Pilo-20 (20 µg/h) e Pilo-40 (40 µg/h)

Presenta limitazioni legate a problemi nel posizionamento e nella rimozione e, al momento, gli vengono preferite formulazioni topiche più efficaci, anche se, rispetto a queste, mantiene vantaggio di un rilascio costante nel tempo. (Kompella et Al, 2011; <http://dctf.uniroma1.it/galenotech/>)

Vitrasert® (Bausch&Lomb, Inc., Rochester, NY/pSivida Ltd.) è un inserto tipo matrice da impiantare nel corpo vitreo, approvato dalla FDA per la cura di infezioni retiniche da Citomegalovirus collegate a AIDS, che presentano immediati rischi per la visione.

La riserva è costituita da una piccola compressa di 4,5 mg di ganciclovir e 0,015 mg di stearato di magnesio, racchiusa da due membrane concentriche, quella più interna semipermeabile (a base di PVA) e quella più esterna impermeabile (EVA), ma dotata di un punto di discontinuità che permette la diffusione del principio attivo.

Questo sistema rilascia il farmaco per 5-8 mesi e permette di raggiungere concentrazioni intavitreali significativamente più alte di quelle che si ottengono attraverso la semplice somministrazione sistemica. (Kompella et Al., 2011; ec.europa.eu/health/documents/community-register/.../anx_2995_it.pdf)



Figura 2.3 I-vation

I-vation™ (SurModics, Inc., Eden Prairie, MN) è un impianto intravitreale, dedicato alla cura dell'edema maculare diabetico. È costituito da una parte interna di una lega metallica non ferrosa a forma di elica ricoperta di un polimero contenente triamcinolone acetone. Il polimero è costituito da una miscela brevettata di polibutilmetacrilato (PBMA) e alcool polivinilico (PVA) che, in funzione delle diverse proporzioni tra i polimeri, permette di controllare la velocità (1-3 $\mu\text{g}/\text{die}$) e la durata del rilascio (4-6 mesi). Il design elicoidale è simile a quello degli stent cardiovascolari ed è stato scelto per rendere maggiore l'area superficiale del dispositivo. Inoltre l'elica è dotata di una estremità affilata usata per fare l'incisione nella sclera e facilitare l'impianto del dispositivo.

Lo sviluppo di questo dispositivo è stato fermato nel 2008 nella Fase II di trials clinici a fronte degli effetti collaterali osservati, quali innalzamento della pressione intraoculare, endoftalmiti, emorragie congiuntivali, opacizzazione del cristallino. (Kompella et Al., 2011)

Iluvien™ (inizialmente sviluppato da Medidur e successivamente da AlimeraSciences, Inc., Alpharetta, GA, USA) è un impianto intravitreale a forma di bastoncino (3,5x0,37 mm), contenente fluocinolone acetone e costituito da PVA. Esistono due versioni del dispositivo, una versione ad alto dosaggio (0,5 $\mu\text{g}/\text{die}$ per 18-24 mesi), ed una a basso dosaggio (0,2 $\mu\text{g}/\text{die}$ per 24-30 mesi) in cui silicone biadesivo è aggiunto al PVA.

Il dispositivo viene impiantato nella parte inferiore del vitreo per massimizzare l'esposizione della retina e minimizzare quella della camera anteriore; un sistema iniettore brevettato dotato di una apertura 25 gauge consente il corretto posizionamento.

Attualmente è nella Fase III dei trials clinici e non sono ancora stati diffusi dati sulla sua efficacia e sicurezza. (Kompella et Al., 2011)

Lumitect® (Lux Biosciences) è un dispositivo a base di ciclosporina in via di sperimentazione clinica per la cura della Malattia del trapianto contro l'ospite che si manifesta a livello oculare (GVHD ocular graft-versus-host disease) e proposto nel rigetto della cornea trapiantata (corneal allograft disease). L'impianto è costituito

da una matrice di silicone che viene impiantata a livello episclerale e di esso ne sono state progettate due forme che differiscono per la velocità di rilascio: 25 µg/die e 15 µg/die. (Kompella et Al., 2011)

Latanoprost Punctual Plug Delivery System (QLT, Inc.) “punctual plug” è il nome di una classe di dispositivi oculari che vengono impiantati nell’apertura del dotto lacrimale per ostruirlo ed evitare così il deflusso del fluido lacrimale; il Latanoprost Punctual Plug delivery system è un sistema oculare medicato che rilascia latanoprost lungo un periodo di 3 mesi e indicato per la cura del glaucoma. Attualmente è in corso la sperimentazione di Fase II. (Kompella et Al., 2011)

2.4 INSERTI A BASE DI POLIMERI BIODEGRADABILI

Per essere definito biodegradabile un polimero deve essere solubile nei fluidi biologici, dove viene degradato attraverso le normali vie metaboliche in molecole innocue che non causano reazioni avverse né a breve né a lungo termine all'organismo; ad esempio i metaboliti del copolimero a base di PLA e PLGA sono acido lattico e glicolico, due sostanze naturalmente presenti nell'organismo che vengono convertite in acetil-CoA, consumato poi nel ciclo dell'acido citrico.

Polimeri biodegradabili sono già ampiamente usati nella tecnologia oculare per aumentare la viscosità di soluzioni, come agenti mucoadesivi, in lenti a contatto medicate ed in formulazioni iniettabili come liposomi, idrogel, microemulsioni, nano-sospensioni, microsfere, microcapsule etc.

I polimeri biodegradabili possono essere di origine sintetica (acido poli-lattico, acido poli-lattico e glicolico, poli-ε-caprolattone, poli-ortoesteri, polianidridi) o naturale (collagene, gelatina, chitosano, albumina del siero bovino e albumina umana).

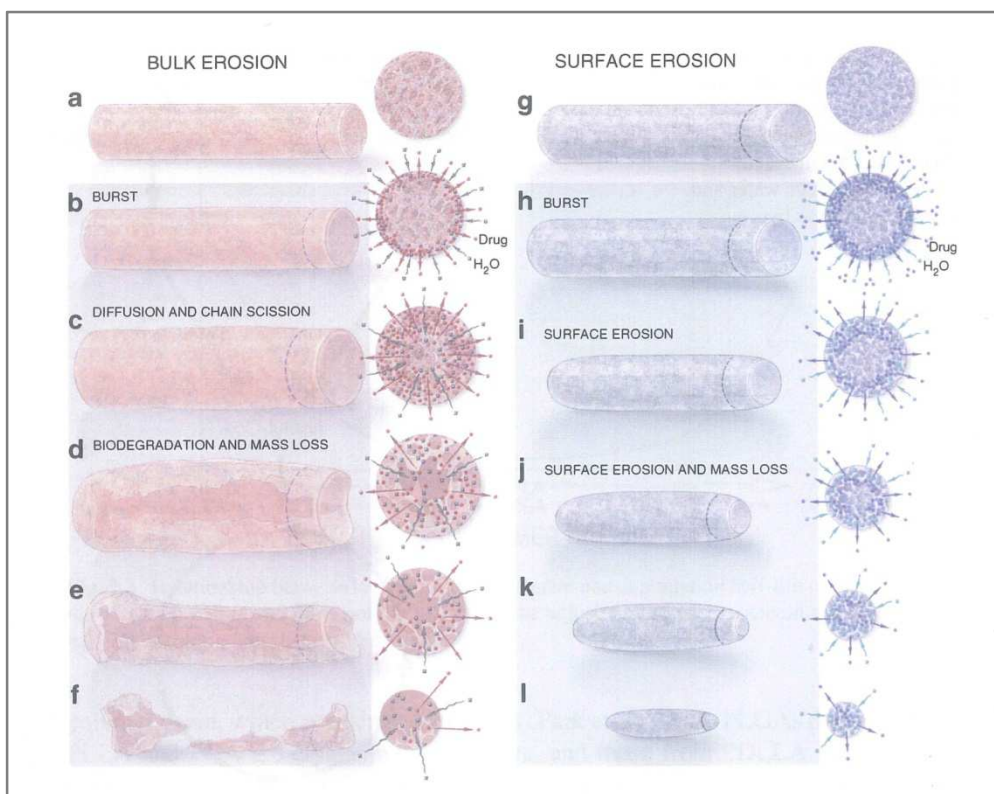


Figura 2.4 Erosione in massa ed erosione superficiale di un inserto biodegradabile

Il rilascio del farmaco avviene contestualmente all'erosione del dispositivo che può avvenire nell'intera massa o esclusivamente sulla superficie. Nel primo caso l'impianto non idratato mostra una struttura porosa, al cui interno si trovano disperse le molecole di farmaco. Il fenomeno del rilascio del farmaco può essere schematizzato come in Figura 2.4: (a) subito dopo il posizionamento nel sito oculare

prescelto si osserva una fase di rilascio sostenuto del farmaco (burst effect), dovuto all'acqua dell'ambiente esterno che inizia a permeare attraverso il polimero e solubilizzare il farmaco intrappolato sulla superficie che diffonde velocemente all'esterno; (b) man mano che l'acqua riesce a penetrare in profondità nell'inserto, rigonfiandolo, le catene idratate di polimero si solubilizzano e possono subire scissione casuale; infine, (c), quando la maggior parte del farmaco è ormai stata rilasciata dall'inserto, si assiste alla fase di biodegradazione e di perdita di massa, il dispositivo mostra una struttura deformata che progressivamente scompare (d-f). Nel secondo caso, l'erosione superficiale inizialmente ricalca quanto avviene per l'altra tipologia, ovvero l'inserto secco e poroso posto in una fase acquosa dà origine ad un iniziale burst effect (g), causato dall'acqua che idrata lo strato più superficiale di polimero. Tuttavia in questo caso la permeazione dell'acqua va di pari passo con la solubilizzazione del polimero e del farmaco (h), che avviene quindi solo superficialmente. Si può osservare così una progressiva diminuzione del volume e della superficie che si conclude con la completa solubilizzazione dell'inserto (i-l).

In seguito sono stati descritti gli inserti di questo tipo compreso quello costituito di HPC presente in commercio. (Kompella et Al., 2011)

Lacrisert® (Aton Pharma, Inc., Lawranceville, NJ) è un inserto oftalmico introdotto nel 1981, si presenta come un bastoncino traslucido, solubile in acqua e biodegradabile; non è destinato all'impianto nella camera posteriore, ma al quotidiano posizionamento nel fornice congiuntivale inferiore ad opera del paziente stesso.

L'inserto è costituito da 5 mg di HPC, che, nell'arco della giornata, si solubilizza nel fluido lacrimale rendendolo più viscoso e prolungando così il tempo di residenza del film lacrimale sulla superficie oculare. L'uso di questo sistema è indicato per la sindrome dell'occhio secco moderata e severa e per la cheratite secca, in particolare per quei pazienti che non hanno vantaggi dalla terapia con lacrime artificiali; è generalmente ben tollerato e sembra fornire più sollievo rispetto all'applicazione di lacrime artificiali 4 volte al giorno. (Kompella et Al., 2011)

Surodex™ (Allergan, Inc., Irvine, CA) è un impianto biodegradabile attualmente in fase di sperimentazione, dedicato al controllo del flare che insorge dopo interventi chirurgici di cataratta. Il bastoncino di PLGA e HPMC (1.0x0,5 mm) viene posizionato nella camera anteriore senza l'ausilio di suture e rilascia 60 µg di desametasone nell'arco di 7-10 giorni. La sperimentazione in corso ne ha dimostrato il potere antiinfiammatorio e una significativa diminuzione dell'insorgenza di infezioni a carico della camera anteriore. (Kompella et Al., 2011)

Verisome™ (Ramscor, Inc., Menlo Park, CA) è una tecnologia di drug delivery intraoculare basata su un materiale non polimerico, brevettato e biodegradabile che può essere somministrato all'interno del bulbo oculare tramite una iniezione standard con ago 30 gauge, in forma solida, liquida o gelificata. La durata d'azione

del sistema può essere modulata a seconda delle necessità terapeutiche, infatti questa tecnologia si può adattare a molti farmaci diversi: piccole molecole, peptidi, proteine e anticorpi monoclonali.

Il prototipo IBI 20089 basato sulla tecnologia Verisome™ (IconBiosciences, Inc.) contenente triamcinolone acetonide, è in Fase II di sperimentazione clinica per la cura di edema maculare cistoide con occlusione delle vene retiniche. Il dispositivo è in forma di gel e viene somministrato tramite iniezione nel corpo vitreo. La durata del dispositivo dipende dal volume iniettato, la sperimentazione comprende due dosaggi diversi: 25 µL (durata 6 mesi) e 50 µL (durata 12 mesi) (<http://iconbioscience.com/ibi-20089/>; Kompella et Al., 2011)

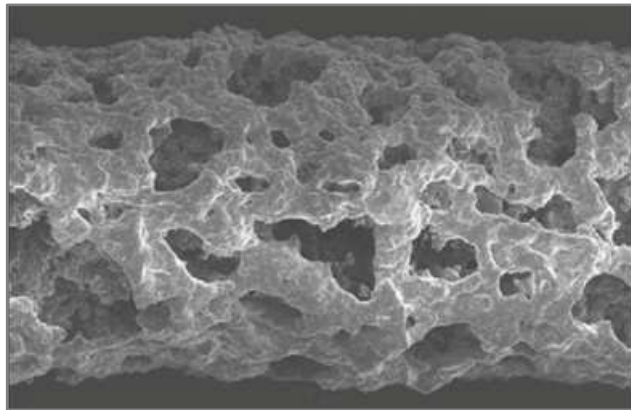


Figura 2.3 impianto Orzudex™ tre settimane dopo il posizionamento in sito.

Orzudex™ (precedentemente sviluppato da Posudrex, in seguito Allergan Inc., Irvine, CA) è un sistema impiantabile biodegradabile costituito di PLGA e contenente 0,7 mg di desametasone; è dedicato alla cura dell'edema maculare di diversa origine: diabetico, da occlusione delle vene retiniche, uveiti, sindrome di Irvine-Glass.

Il dispositivo, a forma di bastoncino, viene impiantato nella camera vitreale per mezzo di un applicatore che lo inietta in corrispondenza della pars plana, evitando così un intervento chirurgico vero e proprio. Orzudex è progettato per rilasciare il farmaco nell'arco di 12 mesi in maniera bifasica, nei primi due mesi di terapia infatti la dose rilasciata è significativamente maggiore rispetto ai mesi rimanenti.

Ha ottenuto l'approvazione dell'FDA nella terapia dell'edema maculare causato da occlusione delle vene retiniche ed, allo stato attuale, è in corso una approfondita e promettente sperimentazione su pazienti affetti da edema maculare di diversa origine. Alcuni moderati effetti collaterali sono stati rilevati durante la sperimentazione clinica: flare della camera anteriore (5% per i pazienti trattati con Orzudex™, 0% pazienti del gruppo di controllo), e aumento della pressione intraoculare (rispettivamente 6% contro 0% del gruppo di controllo); solo il 2% dei

trattati ha mostrato un aumento della pressione intraoculare maggiore di 10 mmHg, rispetto al valore di partenza, dopo 90 giorni dall'intervento. (Kompella et Al., 2011)

II. PARTE SPERIMENTALE

3. SCOPO DELLA TESI

La presente tesi ha come fine la messa a punto di un inserto oculare per il rilascio di fluocinolone acetone nella camera posteriore dell'occhio per proporre una terapia che aggiri gli ostacoli che tradizionalmente interessano la somministrazione dei farmaci nel segmento posteriore dell'occhio.

In un primo tempo il lavoro si è concentrato sulla preparazione di un sostituto artificiale dell'umor vitreo in cui studiare gli inserti polimerici; in particolare sono state confrontate le caratteristiche reologiche di gel di agar e acido ialuronico a diverse concentrazioni e un idrogel di PVA reticolato e acido ialuronico perfezionato rispetto a un precedente lavoro di tesi.

In un secondo momento l'attenzione si è concentrata sulla scelta dell'inserto che, tra quelli forniti dal gruppo di ricerca di Tecnologia farmaceutica del Dipartimento di Scienze farmaceutiche dell'Università di Milano (Prof. Gazzaniga), sembrava possedere il profilo di rigonfiamento e dissoluzione più adatto ai nostri scopi.

La selezione è stata effettuata osservando il comportamento degli inserti, opportunamente dimensionati, in diversi mezzi: tampone Sørensen fosfato isotonic, umor vitreo di coniglio e nel gel di agar e acido ialuronico precedentemente messo a punto come vitreo artificiale.

Infine è stato prodotto l'inserto HF HPC contenente fluocinolone acetone al 3% p/p dal laboratorio del Prof Gazzaniga e ne è stata studiata la velocità di rilascio del farmaco.

Gli inserti sono stati osservati a 37°C sotto agitazione in tampone Sørensen fosfato isotonic pH=7,4 e in gel di agar-acido ialuronico. In entrambi i casi aliquote del mezzo di dissoluzione sono state analizzate mediante HPLC per definire il profilo di concentrazione del farmaco nel tempo

4. METODI

4.1 MATERIALI

- Alcool polivinilico, (PVA) 26-88, Merk, Germania;
- Acido ialuronico (HA), ACEF spa, Italia;
- Agar (AG), ACEF spa, Italia;
- Trimetil fosfato di sodio (STMP), Sigma Aldrich, Germania
- Etil cellulosa, per la preparazione delle matrici
- Idrossipropilcellulosa (HPC), per la preparazione delle matrici, di tipo KLUCEL® HF (PM 1150000)
- Tutte le altre sostanze chimiche e solventi utilizzati erano di grado chimico

4.2 MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI VITREO ARTIFICIALE

4.2.1 Preparazione di un idrogel sostituto dell'umor vitreo a base di alcool polivinilico e acido ialuronico

Per la messa a punto di un idrogel sostituto dell'umor vitreo è stata presa in considerazione la possibilità di utilizzare l'alcool polivinilico reticolato arricchito di acido ialuronico (PVA-HA) già sviluppato in un precedente lavoro di tesi, basatasi sulla rielaborazione del lavoro di *Leone et al. (2010)*. In particolare, dallo studio preliminare, era stato selezionato l'idrogel costituito da alcool polivinilico al 12.0% p/p addizionato di acido ialuronico allo 0.1% p/p. Il PVA e l'HA in polvere venivano posti in acqua a caldo (40°C) sotto agitazione magnetica fino a completa dispersione. La reticolazione veniva condotta ponendo la dispersione polimerica addizionata di NaOH 2N goccia a goccia fino a pH=12 sotto agitazione a 70°C per 2 ore e addizionando un volume prestabilito di soluzione acquosa (4.45 mL) del reticolante all'1.0 %, in modo da avere un rapporto 1:8 tra le moli di trimetil fosfato di sodio (STMP) e quelle di PVA. Dopo l'aggiunta di reticolante si provvedeva a controllare il pH integrando eventualmente con NaOH goccia a goccia per mantenere il pH=12.

Questo procedimento portava alla formazione di un idrogel (PVA-HA pH12) non omogeneo nella struttura, fortemente basico e quindi non corrispondente alle

condizioni fisiologiche. Pertanto, questo modello di umore vitreo artificiale non è stato ritenuto idoneo ai nostri scopi.

In questo lavoro di tesi è stata tentata una variazione del metodo proposto: la quantità totale di STMP aggiunta in più aliquote è rimasta invariata rispetto al PVA, ovvero in rapporto 1:8 con PVA, ma è stata ridotta la concentrazione della soluzione di reticolante fino allo 0.05% p/p. Tale diluizione ha permesso un maggior controllo della quantità di STMP aggiunta ed ha favorito una reticolazione uniforme del PVA.

Inoltre, nel tentativo di ottenere un idrogel neutro, è stata diminuita la quantità di NaOH che veniva aggiunta alla soluzione durante la reazione. In dettaglio, è stata condotta una prima prova su 100 g di dispersione polimerica alcalina per NaOH al 12% p/p di PVA e 0.1% p/p di HA, a cui veniva addizionato STMP allo 0.05% p/p ed un totale di circa 9 mL di NaOH 2N per portare a completamento la reazione di reticolazione mantenendo comunque il pH alcalino.

In seguito sono state condotte altre prove di reticolazione in cui è stata diminuita progressivamente la quantità di NaOH addizionata, fino ad arrivare ad utilizzare 2 mL di NaOH per 100 g di dispersione polimerica e senza integrare NaOH al termine della reazione. L'idrogel ottenuto (PVA-HA pH7) è risultato sufficientemente reticolato, neutro, di aspetto omogeneo e trasparente. Pertanto, solo quest'ultimo idrogel ha avuto accesso alla fase della caratterizzazione reologica.

Per ottenere 100.0 g di idrogel PVA-HA pH7, è stata eseguita la seguente procedura:

- 12.0 g di PVA e 0.1 g di HA sono stati dissolti in 85.0 g di acqua deionizzata (milliQ) riscaldata a 40°C. Alla dispersione sono stati aggiunti 2 mL di NaOH 2N e 8.9 mL di soluzione allo 0.05% p/p di STMP (densità =1.0) goccia a goccia sotto agitazione a 70°C. Dopo 2 ore in queste condizioni sperimentali l'idrogel veniva riportato a peso con l'acqua deionizzata.

4.2.2 Preparazione di un idrogel sostituto dell'umor vitreo a base di agar e acido ialuronico

L'idrogel (AGR-HA) a base di agar (AGR) e acido ialuronico (HA) è stato preparato disperdendo in acqua a 100°C una quantità esattamente pesata delle polveri e mantenendo la sospensione alla temperatura di 100°C sotto agitazione per circa 15 minuti per permettere la completa dispersione delle polveri. In seguito la soluzione veniva lasciata a riposo a temperatura ambiente per 24 ore in modo da permettere la formazione del gel. In seguito il gel è stato omogeneizzato mediante omogeneizzatore ad immersione della ditta Ystral (mod. T1500).

Sono stati prodotti diversi idrogel con i due componenti in concentrazioni variabili la cui composizione è riportata in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 – Composizione degli Idrogeli a base di Agar

IDROGEL	AGR %p/p	HA %p/p
AGR-HA 3.0	3.0	-
AGR-HA 3.1	3.0	1.0
AGR-HA 3.2	3.0	2.0
AGR-HA 4.1	4.0	1.0

4.3 CARATTERIZZAZIONE REOLOGICA DEGLI IDROGELI

La caratterizzazione reologica degli idrogeli è risultata essenziale per selezionare un modello di vitreo artificiale con caratteristiche il più possibile simili a quelle del corpo vitreo umano. In particolare, sono state condotte misure sia di viscosità che di viscoelasticità mediante viscosimetro rotativo Rheostress RS 1 Haake, usando corpi di misura piastra/cono P61 e C60/4°.

Le misure sono state condotte sia a 37°C che a 21° C. La temperatura di 37°C è stata scelta poiché corrispondente a quella dei fluidi biologici e quindi appropriata per la caratterizzazione del comportamento tecnologico dei modelli di vitreo artificiale da utilizzare in step successivi per la caratterizzazione degli inserti polimerici allo studio. La temperatura di 21°C è stata scelta per poter confrontare i risultati ottenuti per gli idrogeli allo studio con dati relativi a modelli di vitreo artificiale riportati in letteratura (*Bonfiglio et al. 2012; Kummer et al., 2007*).

Per determinare la viscoelasticità lineare sono state eseguite misure di stress sweep (scansione di carico) per determinare l'intervallo di stress al quale gli idrogeli rispondono facendo variare G' e G'' in maniera lineare; in questo caso è stato fatto variare lo sforzo di taglio (τ) applicato al polimero tra 0 e 700 mPa, mantenendo costante la frequenza (f) a 1 Hz.

È stata eseguita anche un'altra serie di misurazioni volta a determinare il frequency sweep, in questo caso è stato mantenuto costante lo sforzo di taglio ($\tau=510$ mPa) ed è stata fatta variare la frequenza tra 0 e 10 Hz

4.4 PREPARAZIONE DEGLI INSERTI

Gli inserti sono stati forniti dal laboratorio del Prof. Gazzaniga, del Dipartimento di scienze del farmaco dell'Università di Milano.

La loro produzione è avvenuta applicando una tecnica di estrusione mediante l'utilizzo di un estrusore bivate conico a temperature comprese tra 140°C e 180°C, venivano fornite lingue di spessore nominale 1.0 mm, larghezza 4.0 mm e lunghezza 250.0 mm, dalle quali mediante l'utilizzo di un bisturi abbiamo ottenuto inserti a forma di parallelepipedo, di misure medie 1.0 x 2.0 x 10.0 mm (spessore x larghezza x lunghezza) e del peso compreso tra 0.015 e 0.030 g.

La Tabella 6.3 riporta la composizione degli inserti studiati.

4.5 VELOCITÀ DI DISSOLUZIONE DEGLI INSERTI

La valutazione preliminare del profilo di dissoluzione degli inserti è stata condotta mediante l'osservazione visiva degli stessi. Gli inserti sono stati posti su un vetrino da orologio ed immersi in 2 mL di un opportuno mezzo di dissoluzione. Per rendere visibile il comportamento dell'inserto durante il processo di idratazione, venivano addizionati al mezzo di dissoluzione 10.0 µL di una soluzione allo 0.02% p/p di blu di metilene (concentrazione finale di blu di metilene nel mezzo 0.002% p/p).

A vari tempi un'immagine degli inserti veniva acquisita mediante un sistema ottico (Dino-Lite microscopio digitale, Italeco) ed elaborata tramite software dedicato.

I mezzi di dissoluzione utilizzati nello studio sono stati: **a)** umor vitreo di coniglio, **b)** tampone fosfato Sørensen isotonic pH 7.4 (PBS) e **c)** umor vitreo artificiale AGR-HA 4.1. La valutazione della velocità di idratazione degli inserti è stata eseguita per tutti gli inserti presi in considerazione a temperatura ambiente, e per alcuni di essi, ripetuta a 32 e 37°C.

Durante l'idratazione veniva osservata la capacità della soluzione colorata di penetrare all'interno degli inserti (fronte del solvente), la trasparenza dell'inserto, il mantenimento della forma e veniva considerato quale end-point del test la perdita di forma e/o la presenza di una massa di gel sul vetrino da orologio.

4.6 RILASCIO IN VITRO DEL FLUOCINOLONE ACETONIDE

4.6.1 Rilascio in vitro del fluocinolone acetoneide dall'inserto HF-FLUO in tampone fosfato mediante metodo del cestello rotante

L'inserto in fase di sviluppo deve essere impiantato chirurgicamente nel corpo vitreo e deve permanere in questa sede per lunghi periodi (fino a 30 mesi), rilasciando una quantità costante di fluocinolone acetoneide.

Per la messa a punto di un inserto intravitale, dopo una prima fase di studio in cui è stata effettuata una valutazione visiva della velocità di dissoluzione degli inserti a disposizione, è stato ritenuto necessario procedere alla misurazione quantitativa della quota di farmaco rilasciata. Per la sua determinazione è stato utilizzato il sistema a cestello rotante secondo la seguente metodica: un inserto accuratamente pesato veniva inserito in un cestello costituito da una rete metallica, miniaturizzato rispetto a quello riportato in F.U.

L'inserto veniva immerso in 10 mL di fase ricevente costituita da tampone fosfato Sörensen pH=7.4 isotonic (PBS), mantenuto a 37°C. I cestelli sono stati sottoposti ad agitazione costante (20 giri/min) per favorire il processo di dissoluzione. Durante il test aliquote di fase ricevente sono state prelevate ad intervalli di tempo regolari e opportunamente diluite con PBS, prima di essere sottoposte ad analisi HPLC. Il volume di fase ricevente rimosso veniva sostituito con tampone fresco. La concentrazione di farmaco è stata determinata per confronto con una retta di taratura esterna costruita con concentrazioni note di fluocinolone acetoneide comprese nel range

0.5 - 5 µg/mL addizionate di una quantità nota del polimero che costituisce gli inserti (idrossipropilcellulosa,HF).

La durata dell'esperimento di rilascio *in vitro* del farmaco era di 24 ore e ciascuna prova è stata ripetuta almeno 4 volte allo scopo di ottenere dati statisticamente significativi.

4.6.2 Rilascio del fluocinolone dall'inserto HF-FLUO in idrogel di agar

L'ultima fase dello studio è stata rivolta all'analisi del rilascio del fluocinolone acetoneide dagli inserti, utilizzando quale mezzo di dissoluzione il modello di vitreo artificiale a base di agar precedentemente messo a punto. Per questo scopo è stato scelto l'idrogel di agar e acido ialuronico al 4% ed all' 1% p/p rispettivamente (AGR-HA 4.1). L'idrogel (4.0 mL) veniva posto in una vial ed in esso veniva inserito un inserto del peso compreso tra 0.015 e 0.030 g. Le vials venivano poste in bagno

termostato a 37°C e sottoposte a blanda agitazione, per simulare i movimenti che possono interessare il globo oculare. La lenta velocità di diffusione del farmaco nell'idrogel rendeva la concentrazione dello stesso disomogenea nel mezzo viscoso e ciò ha impedito di prelevare aliquote di idrogel dalle vials rappresentative della concentrazione di farmaco rilasciate. Non potendo procedere a successivi prelievi di aliquote di idrogel di agar dallo stesso campione, è stata preparata una vial per ciascun tempo di campionamento (test one-point).

Ogni vial conteneva 4.0 mL (prelevati con l'aiuto di una siringa) dell'idrogel AGR-HA 4.1 e nel centro era posizionato un inserto, che veniva rimosso allo scadere del tempo previsto.

Prima dell'analisi HPLC la vial veniva posta per un minuto in bagnomaria a 100°C sotto agitazione magnetica per rendere uniforme la concentrazione di farmaco e, in seguito, veniva prelevata una piccola aliquota di idrogel (100 µL) da cui veniva estratto il farmaco per aggiunta di 900 µL di metanolo, agitazione sul vortex e centrifugazione a 13'000 giri (centrifuga IEC Microcl17, Thermo Electron Corporation). I campioni così ottenuti sono stati analizzati all'HPLC per ottenere il profilo di rilascio di fluocinolone nelle 24 ore. Per ciascun tempo di campionamento sono state eseguite 3 prove.

4.7 ANALISI QUANTITATIVA DEL FLUOCINOLONE ACETONIDE MEDIANTE HPLC

La determinazione quantitativa del fluocinolone acetoneide è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). L'apparecchiatura era costituita da una pompa Shimadzu LC6A con rivelatore Shimadzu UV-VIS 10 A. La valvola di iniezione era una Rheodyne con capacità pari a 20 µL.

La colonna, a fase inversa, era una Kinetex C18 100 A (150 x4.6 mm) impaccata con fase da 5 µm (Phenomenex). La fase mobile era costituita da una miscela di acqua MilliQ e metanolo (45:55). Tutti i solventi utilizzati erano HPLC grade e sono stati degassati prima dell'uso utilizzando il sonicatore. La velocità di flusso era 1.0 mL/min e la pressione media risultante 160 kgf/cm². La lunghezza d'onda utilizzata per la determinazione quantitativa del fluocinolone acetoneide era 238 nm ed il suo tempo di ritenzione uguale 8.0 minuti.

Nell'analisi del rilascio del farmaco tramite cestelli rotanti la concentrazione di farmaco nei campioni di fase ricevente è stata determinata per confronto con una retta di taratura esterna costruita con concentrazioni note di fluocinolone acetoneide comprese nel range 0.5 – 5.0 µg/mL addizionate di una quantità nota del polimero che costituisce gli inserti (idrossipropilcellulosa,HF).

Per la preparazione della soluzione polimerica da aggiungere agli standard, un inserto di HPC-HF esattamente pesato veniva dissolto in 10 mL di PBS ed in seguito

la soluzione veniva diluita con lo stesso tampone per ottenere due soluzioni polimeriche standard **1** (diluizione 1:4) e **2** (diluizione 1:9). Le due soluzioni polimeriche **1** e **2** sono state utilizzate in rapporto 1:1 con soluzioni a concentrazione standard di fluocinolone comprese tra 1.0 – 10 µg/mL in PBS per ottenere due serie di campioni **A** e **B** contenenti rispettivamente due diverse quantità di polimero, una il doppio dell'altra, con le quali è stata costruita la curva di taratura.

Nell'analisi del rilascio nell'idrogel di agar la concentrazione di fluocinolone è stata determinata per confronto con una retta di taratura esterna costruita con concentrazioni note del farmaco in metanolo.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

Al fine di studiare la velocità di rilascio in vitro del farmaco dagli inserti destinati all'impianto intravitreo è stato ritenuto essenziale mettere a punto un modello di corpo vitreo artificiale in grado di simulare l'umor vitreo umano. La messa a punto di un modello di umor vitreo artificiale ha costituito quindi il primo step del lavoro di tesi.

Inizialmente sono stati presi in considerazione i risultati ottenuti nell'ambito di un precedente studio svolto presso il laboratorio di Tecnologia Farmaceutica, in cui, a seguito di un processo di reticolazione di una matrice viscosa di PVA e HA, era stato prodotto un idrogel a pH alcalino (PVA-HA pH12) quale modello di umore vitreo artificiale; la nostra ricerca si è indirizzata verso una nuova metodica preparativa che ha previsto la modifica delle condizioni sperimentali di produzione dell'idrogel a base di PVA e HA e l'utilizzo di nuovi materiali polimerici.

L'obiettivo da raggiungere è stato quello di mettere a punto un idrogel con caratteristiche simili all'umor vitreo umano sia dal punto di vista "meccanico" (analisi reologica) che "chimico" (valore di pH).

Il corpo vitreo è un gel trasparente costituito al 99% da acqua, acido ialuronico e collagene ed ha funzioni di sostegno, di protezione del globo oculare ed è dotato di caratteristiche diottriche. Esso è un fluido di natura viscoelastica, con componente elastica superiore alla componente viscosa, e pH compreso tra 7.0 e 7.4. Le proprietà meccaniche del corpo vitreo dipendono dalle specifiche proprietà possedute sia dalle fibrille di collagene che dalle macromolecole ad alto peso molecolare di acido ialuronico che lo compongono e formano un network molto labile. La relazione tra la composizione e la microstruttura del corpo vitreo, essenziale per il mantenimento delle sue funzioni fisiologiche, non è stata definita con certezza, essenzialmente per la mancanza di metodi sperimentali di indagine adeguati. Molti autori sottolineano la complessità delle misurazioni reologiche sul corpo vitreo e imputano la difficoltà di misura alla facilità con cui questo perde la sua struttura originaria non appena rimosso dalla sede naturale.

Le misure reologiche più usate prevedono sia misure di viscosità che di viscoelasticità, quali test di tipo "strain sweep" e test di tipo "frequency sweep".

Nel tentativo di ottimizzare il modello di umor vitreo artificiale, abbiamo ritenuto importante mantenere la presenza dell'acido ialuronico ritenuto responsabile dello swelling del fluido biologico. L'acido ialuronico, secondo quanto riportato da alcuni autori (Nickerson et al., 2008), è responsabile del cosiddetto "effetto Donnan", ovvero la pressione idrostatica provocata dalla presenza di macromolecole cariche quali l'acido ialuronico, genera una forza rivolta verso la periferia semipermeabile del corpo vitreo, controbilanciata dalla resistenza offerta dalle fibrille di collagene che, per la loro struttura, possono allungarsi e tendersi.

Nel modello di vitreo artificiale messo a punto in questo lavoro di tesi, sono stati scelti quali materiali in grado di simulare il comportamento delle fibrille di

collagene, prima l'alcool polivinilico (PVA) reticolato e successivamente l'Agar (AGR).

La variazione del comportamento reologico, valutata dalla variazione dello sforzo di taglio (τ) misurato in funzione del gradiente di velocità ($\dot{\gamma}$) per gli idrogeli PVA-HA pH7 e AGR-HA alla temperatura di 37°C, è stato riportato nei Grafici 7.1 - 7.5, mentre esclusivamente per quello a base di AGR-HA 4.1 la variazione è stata analizzata anche a 21°C ed i risultati sono stati riportati nel Grafico 7.6.

L'idrogel a base di PVA-HA pH7 mostra un comportamento newtoniano con valore di viscosità calcolato per regressione lineare dei punti sperimentali di 1,482 Pa s. Il comportamento degli idrogeli a base di Agar, indipendentemente dalla temperatura alla quale è stata effettuata la misura, risulta pseudoplastico con lieve tissotropia. E' evidente un sostanziale aumento della viscosità quando agli idrogeli di AGR venivano aggiunte quantità crescenti di HA: i valori di viscosità calcolati per regressione dei punti sperimentali riportati in scala logaritmica indicano valori di viscosità crescenti da 1.717 a 3.988 Pa s a $D=1\text{ s}^{-1}$; e da 0.289 a 0.722 Pa s per $D=10\text{ s}^{-1}$ a 37°C, passando dal 60.0% (AGR-HA 3.1) al 80.0% (AGR-HA 3.2) (v. Tabella 6.1).

Nonostante i dati raccolti siano preliminari e poco numerose siano le miscele polimeriche saggiate, il trend che possiamo osservare ci porta a ipotizzare che la viscosità sia influenzata in misura maggiore dalla quantità di Agar, piuttosto che dalla quantità di acido ialuronico.

La determinazione della viscoelasticità è stata condotta sull'idrogel PVA-HA pH7 alla temperatura di 37°C e sull'idrogel di agar e acido ialuronico risultato il più viscoso dall'analisi reologica (AGR-HA 4.1) sia a 37°C che alla temperatura di 21°C.

I materiali viscoelastici presentano un comportamento intermedio tra i materiali puramente viscosi e i materiali elastici ideali. Per la determinazione delle due componenti (viscosa ed elastica) gli idrogeli sono stati sottoposti ad uno "strain sweep", per definire l'intervallo di viscoelasticità lineare variando lo sforzo di taglio tra 0 e 700 mPa a frequenza costante ($f = 1.0\text{ Hz}$). La rappresentazione grafica dei risultati ottenuti è stata riportata nei Grafici 7.7 – 7.8 per le misure eseguite a 37°C e nel Grafico 7.9 per l'idrogel AGR-HA 4.1 a 21°C.

I comportamenti sono stati diversi per le diverse tipologie di materiali utilizzati e solo alcuni hanno rispettato quanto richiesto, ovvero che il modulo che descrive la capacità di immagazzinare energia elastica (G' , storage modulus, modulo conservativo o modulo elastico) fosse maggiore del modulo che definisce l'energia dissipata (G'' , loss modulus, modulo dissipativo o modulo viscoso), ossia $G' > G''$ (Kummer et al., 2007).

Particolarmente deludente è risultato il profilo di viscoelasticità per il PVA-HA pH7, poiché all'aumento dello sforzo di taglio, dopo una prima fase in cui si evidenziava una significativa variazione di entrambi i moduli, si osservava una stabilizzazione, con il modulo viscoso superiore al modulo elastico ($G'' > G'$) (v. Grafico 7.7). Questo comportamento è tipico di un network polimerico non strutturato, fluido e parzialmente rotto nella sua microstruttura.

Viceversa, per l'idrogel a base di Agar (AGR-HA 4.1), dopo una prima fase di significativa variazione di entrambi i moduli, allo steady state i moduli elastici erano maggiori dei moduli viscosi ($G' > G''$); tale comportamento è tipico dei solidi e dei fluidi altamente strutturati (v. Grafici 7.8 e 7.9).

In dettaglio, per l'idrogel PVA-HA pH7 alla frequenza di 1.0 Hz i valori di G' e G'' erano di circa 1.8 e 14.5 Pa rispettivamente. Gli stessi moduli (G' e G'') risultano significativamente indipendenti dallo sforzo applicato ed uguali a 33.2 e 17.7 Pa e 33.2 e 15.3 [Pa] quando determinati rispettivamente a 37 °e 21°C per l'idrogel di Agar. (v. Tabella 6.2)

Infine sono state condotte misurazioni di frequency sweep sull'idrogel AGR-HA 4.1, in cui si è misurata la variazione dei moduli elastico e viscoso, in funzione della frequenza variabile tra 1 e 10 Hz, a due temperature diverse (21°C e 37°C).

I risultati riportati nei Grafici 7.10 e 7.11 indicano che la risposta di AGR-HA 4.1 alle due temperature è paragonabile. Inoltre risulta evidente che, in misura più significativa a frequenze più elevate, il modulo elastico subisce un significativo aumento, fino a circa 20 % del valore misurato a 1.0 Hz.

Pur essendo difficile confrontare i moduli elastici e viscosi determinati per l'idrogel scelto come sostituto del vitreo biologico (umano e/o animale) con i dati reperibili in letteratura, a causa delle evidenti differenze nei protocolli di trattamento dei campioni biologici da parte dei diversi ricercatori e per l'elevata sensibilità che il corpo vitreo presenta al maneggiamento, i dati riportati non si discostano in maniera sostanziale da quelli misurati per il modello di umore vitreo artificiale AGR-HA 4.1. I moduli G' e G'' sono quantitativamente dello stesso ordine di grandezza dei dati riportati in letteratura e presentano uno stesso trend alle sollecitazioni (frequency sweep test). (Nickerson et al. 2008)

Nel progetto di tesi è stata valutata la capacità di idratarsi di inserti polimerici preparati impiegando polimeri di uso consolidato in campo farmaceutico quali miscele di idrossipropil cellulosa ed etilcellulosa prodotti con la tecnica di estrusione in uso presso il laboratorio di Tecnologia dell'Università di Milano. Le tecniche di estrusione, già diffuse in ambito farmaceutico, possono essere utilizzate per l'allestimento di prodotti diversi e per la loro versatilità è stato progettato di sfruttarle per la realizzazione di sistemi per il rilascio modificato di principi attivi a livello oculare.

La composizione quali-quantitativa degli inserti sottoposti prima a studi di idratazione e, successivamente, a studi di rilascio in vitro del principio attivo, è stata riportata in Tabella 6.3.

I risultati delle prove di idratazione eseguite sui diversi inserti nei vari mezzi di dissoluzione quali: soluzione tampone isotonica (PBS), umore vitreo di coniglio, umore vitreo artificiale (AGR-HA 4.1) sono stati riportati nelle Tabelle 6.4 e 6.5. Le immagini acquisite durante l'idratazione degli inserti a base di HF ed EC sono state organizzate nelle Tabelle 6.6 e 6.7, rispettivamente per la dissoluzione nel vitreo artificiale (AGR-HA 4.1) e in PBS, entrambe a temperatura ambiente.

Nelle Tabelle 6.8 e 6.9 sono state riportate le immagini relative al comportamento degli inserti costituiti esclusivamente da polimero (HF) e polimero

addizionato del 3% di fluocinolone acetoneide (HF-FLUO) eseguiti in PBS a tre diverse temperature, nell'umore vitreo di coniglio recuperato immediatamente dopo in sacrificio dell'animale e in AGR-HA 4.1 a temperatura ambiente.

Gli inserti contenenti etilcellulosa sono stati osservati a temperatura ambiente in PBS e in AGR-HA 4.1 per un lungo periodo (15 giorni) durante il quale sono risultati sostanzialmente insolubili (v. tab. 6.4). Gli inserti infatti, dopo un forte rigonfiamento iniziale, che aumentava in funzione dell'aumento della percentuale di etil cellulosa presente nell'inserto, rimanevano globuli biancastri non completamente idratati. Durante tali prove non sono state evidenziate differenze nella velocità di idratazione nei due mezzi. Alla luce di queste evidenze tali inserti sono stati scartati, sia perché la velocità di dissoluzione sembrava troppo lenta per i nostri scopi, sia perché si è temuto che il forte rigonfiamento potesse arrecare danno alle strutture oculari.

Gli studi di idratazione sugli inserti esclusivamente a base di idrossi propil cellulosa, medicato e non,(v.Tab 6.5), hanno dimostrato la solubilità in ambiente acquoso, al contrario di quanto avveniva per gli inserti contenenti anche etil cellulosa. Inoltre, è stato rilevato che l'aumento di temperatura (da t.a. a 32°C e 37°C) rallentava notevolmente il processo di idratazione. Questo fenomeno è dovuto, con tutta probabilità, alla minore solubilità dell'HF ad alte temperature (HF risulta insolubile in acqua sopra 40°C).

Questa informazione ci ha confermato la necessità di tenere sotto rigoroso controllo la temperatura durante gli esperimenti, allo scopo di ottenere la massima riproducibilità: anche piccole variazioni della temperatura (nell'ordine di qualche grado) potevano influenzare in maniera significativa sia il processo di solubilizzazione del polimero, sia il rilascio del principio attivo dagli inserti. Non sono state evidenziate, invece, significative variazioni tra le prove di idratazione condotte a temperatura ambiente tra i diversi mezzi.

Alla luce dei risultati ottenuti in termini idratazione/solubilizzazione in ambiente fisiologico (PBS) è stato realizzato l'inserto medicato con fluocinolone acetoneide a base esclusivamente di HF. Il quale è stato sottoposto a prove di idratazione e di rilascio in vitro del principio attivo. Dal confronto con le corrispondenti prove condotte sull'inserto non medicato è stata dimostrata la sostanziale ininfluenza del farmaco sul profilo di dissoluzione dell'inserto (v. Tabella 6.8)

L'inserto HF contenente FLUO è stato sottoposto a test di dissoluzione che aveva lo scopo di mettere in evidenza la cinetica di rilascio del farmaco e confermare se, come ipotizzato, poteva essere assicurato, dopo impianto nell'occhio, il mantenimento di una quantità di farmaco rilasciata costante ed in grado di esplicare l'attività terapeutica. Tale studio di rilascio in vitro del fluocinolone è stato condotto sia in PBS (cestello rotante), sia nel vitreo artificiale a base di agar (AGR-HA 4.1). Per l'esecuzione dello studio è stato necessario mettere a punto una metodica analitica HPLC dotata di elevata specificità e sensibilità, in quanto durante il test di dissoluzione i campioni di fase ricevente sottoposti ad analisi, potevano contenere percentuali variabili del polimero che costituiva gli inserti e che durante il processo di rilascio del farmaco si solubilizzava. Infatti, le prove preliminari eseguite

avevano fatto ipotizzare la possibile interferenza del polimero HF, mentre era stato possibile escludere l'interferenza con l'AGR poiché, in seguito al trattamento con metanolo dei campioni di fase ricevente, le piccole quantità di Agar nei campioni venivano allontanate per precipitazione e successiva centrifugazione.

Le curve di taratura del fluocinolone ottenute con standard costituiti da miscele contenenti quantità note di principio attivo e quantità variabili di polimero, riportate nel Grafico 7.12, ci hanno confermato la specificità e sensibilità della metodica messa a punto. Per regressione lineare dei punti sperimentali si ottenevano rette con coefficiente di correlazione (R^2) comprese tra 0.999 e 0.995, e con coefficienti angolari paragonabili.

La percentuale di FLUO ceduta in tampone PBS nel tempo (ore) è stata riportata nel Grafico 7.13 e i punti sperimentali sono stati interpolati secondo l'equazione di Kosmeyer e Peppas:

$$M_t/M_\infty = Kt^n$$

dove il coefficiente n identifica il meccanismo con cui il principio attivo viene ceduto dalla matrice.

Nelle prime 2 ore il fluocinolone veniva rilasciato rapidamente dagli inserti e solo dopo le 5-6 ore, quando la percentuale rilasciata era di oltre il 40%, si evidenziava un rallentamento nel rilascio, per raggiungere il 60% di FLUO rilasciato in 20 ore circa. L'interpolazione dei dati sperimentali secondo l'equazione di Kosmeyer e Peppas indica che il processo di dissoluzione in PBS avviene per diffusione dalla matrice idratata essendo in coefficiente $n=0.502$ ($R^2=0.919$).

Un'altra interpretazione dei dati evidenzia un effetto "burst" con circa il 10% di farmaco rilasciato nei primi 30 minuti, seguito da un breve periodo di un rilascio di ordine zero, fino a circa 8 ore, con una percentuale rilasciata del 50%. Durante questa fase la velocità di rilascio del farmaco corrisponde a 33,35 µg/ora ($R^2=0.978$).

Applicando l'equazione di Kosmeyer e Peppas alla percentuale di FLUO rilasciata nel vitreo artificiale (AGR-HA 4.1), si evidenzia una cinetica di rilascio non diffusiva bensì anomala. Infatti, il valore del coefficiente n risulta uguale 0.664 ($R^2=0.960$). Tuttavia, trascurando l'iniziale rilascio rapido del farmaco (circa il 10% nella prima ora, "effetto burst"), è evidente un periodo intermedio, compreso tra le 2 e le 18 ore, in cui il rilascio di FLUO segue una cinetica di ordine zero con corrispondente quantità di farmaco rilasciata di circa il 70% ad una velocità di 13.98 µg/ora ($R^2=0.920$).

In conclusione, il sistema HF-FLUO non possiede le ideali caratteristiche di rilascio del farmaco che ci eravamo prefissati di ottenere, anche se si può considerare positivo aver individuato una tecnologia di produzione facilmente applicabile (estrusione), dei materiali che potrebbero essere una base da cui partire per lo sviluppo di altre tipologie di inserti oftalmici e un modello sperimentale di umore vitreo utile per ulteriori approfondimenti.

6. TABELLE

Tabella 6.1 - Valori di viscosità per gli idrogeli a base di agar allo studio determinati a diverse temperature

Idrogel	η (D=1) [Pa s]	η (D=10) [Pa s]
AGR-HA 3.0 (37°C)	1.717	0.298
AGR-HA 3.1 (37°C)	1.855	0.381
AGR-HA 3.2 (37°C)	1.700	0.394
AGR-HA 4.1(37°C)	3.988	0.722
AGR-HA 4.1(21°C)	4.664	0.853

Tabella 6.2 Valori modulo elastico e modulo viscoso per gli idrogeli allo studio (strain sweep) misurati a diverse temperature

	G' [Pa] (f=1Hz)	G'' [Pa] (f=1Hz)
PVA-HA pH 7 37°C	1,8	14,5
AGR-HA 4.1 37°C	33,2	17,7
AGR-HA 4.1 21°C	33,2	15,3

Tabella 6.3 Composizione quali-quantitativa degli inserti

INSERTO	POLIMERO		POLIMERO		FLUOCINOLONE ACETONIDE
	molecola	% p/p	molecola	% p/p	% p/p
HF-EC 50-50	Idrossi propil cellulosa KLUCEL® HF	50	Etil-cellulosa ETHOCEL Standard 100 Premium	50	-
HF-EC 70-30	Idrossi propil cellulosa KLUCEL® HF	70	Etil cellulosa ETHOCEL Standard 100 Premium	30	-
HF-EC 90-10	Idrossi propil cellulosa KLUCEL® HF	90	Etil cellulosa ETHOCEL Standard 100 Premium	10	-
HF	Idrossi propil cellulosa KLUCEL® HF	100	-	-	-
HF-FLUO	Idrossi propil cellulosa KLUCEL® HF	97	-	-	3

Tabella 6.4 Comportamento degli inserti contenenti etil cellulosa (non medicati) durante l'idratazione

MEZZO DI DISSOLUZIONE	CORPO VITREO	AGR-HA 4.1	PBS		
TEMPERATURA	t.a.	t.a.	t.a.	32°C	37°C
HF-EC 50-50	-	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda parzialmente, senza dissolversi completamente nè assumere mai l'aspetto di una massa gelificata e trasparente	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda parzialmente, senza dissolversi completamente nè assumere mai l'aspetto di una massa gelificata e trasparente	-	-
HF-EC 70-30	-	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda parzialmente. Dopo 300 minuti la massa appare un poco più gelificata rispetto a HF-EC 50-50, ma rimane una massa biancastra a forma di bastoncino e non si dissolve completamente.	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda parzialmente. Dopo 300 minuti la massa appare un poco più gelificata rispetto a HF-EC 50-50, ma rimane una massa biancastra a forma di bastoncino e non si dissolve completamente.	-	-
HF-EC 90-10	-	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda. Dopo 300 minuti la massa appare più gelificata rispetto a HF-EC 70-30, perde la forma a bastoncino ma rimane una massa biancastra che non si dissolve completamente	Dopo 30 minuti l'inserto appare idratato in superficie, progressivamente rigonfia e si sfalda. Dopo 300 minuti la massa appare più gelificata rispetto a HF-EC 70-30, perde la forma a bastoncino ma rimane una massa biancastra che non si dissolve completamente	-	-
L'OSSERVAZIONE DI TUTTI GLI INSERTI CONTENENTI EC SI E' PROTRATTA PER 15 GIORNI					

Tabella 6.5 Comportamento degli inserti HF e HF-FLUO (medicato) durante l'idratazione

MEZZO DI DISSOLUZIONE	CORPO VITREO	AGR-HA 4.1	PBS		
TEMPERATURA	t.a.	t.a.	t.a.	32°C	37°C
HF-FLUO	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata, ma si distinguono ancora i contorni della porzione non idratata. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino assume la forma di un globulo gelificato.</p> <p><u>Tempo di dissoluzione</u></p> <p>Circa 60 ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata e presenta cavitazioni dovute all'erosione. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino non assume la forma di un globulo gelificato</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>Circa 60 ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata e presenta cavitazioni dovute all'erosione. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino non assume la forma di un globulo gelificato, che, infine, si dissolve completamente</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60 ore</p>	<p>L'idratazione e la solubilizzazione procedono in modo simile a quanto avviene a t.a.</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60 ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è leggermente idratata. Durante il tempo di osservazione il fronte del solvente avanza e il bastoncino rigonfia e si erode parzialmente, ma dopo 24 ore è ancora visibile la forma iniziale</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 120 ore</p>
HF	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata, ma si distinguono ancora i contorni della porzione non idratata. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino assume la forma di un globulo gelificato.</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60 ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata e presenta cavitazioni dovute all'erosione. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino non assume la forma di un globulo gelificato</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60 ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è idratata e presenta cavitazioni dovute all'erosione. Il fronte del solvente avanza finchè il bastoncino non assume la forma di un globulo gelificato, che, infine, si dissolve completamente</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60 ore</p>	<p>L'idratazione e la solubilizzazione procedono in modo simile a quanto avviene a t.a.</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 60ore</p>	<p>Dopo 30 minuti la superficie è leggermente idratata. Durante il tempo di osservazione il fronte del solvente avanza e il bastoncino rigonfia e si erode parzialmente, ma dopo 24 ore è ancora visibile la forma iniziale</p> <p><u>Tempo di dissoluzione:</u></p> <p>circa 120 ore</p>

Tabella 6.6 Dissoluzione di HF-EC in diverse proporzioni in idrogel AGR-HA 4.1 a t.a.

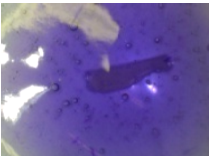
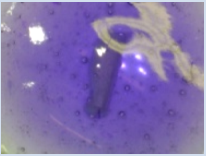
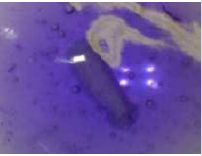
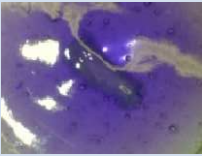

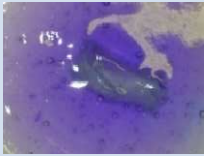
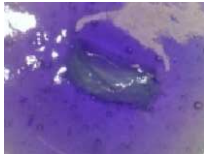
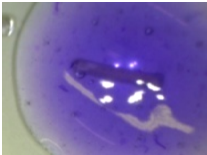
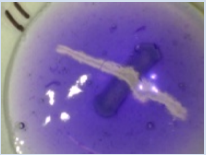



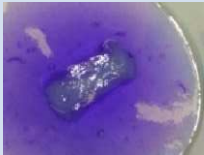
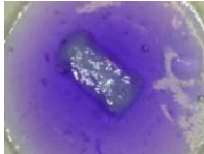
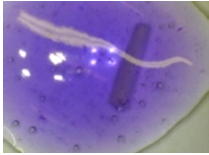
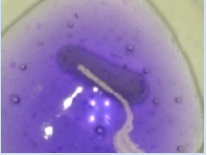
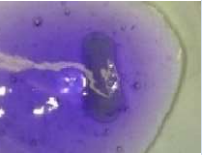
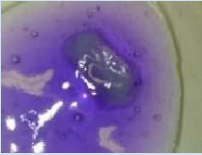
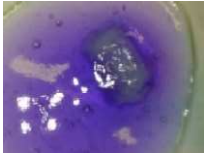
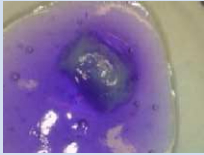

	TEMPO ZERO	30 MINUTI	60 MINUTI	120 MINUTI	180 MINUTI	240 MINUTI	300 MINUTI
HF-EC 50-50							
HF-EC 70-30							
HF-EC 90-10							

Tabella 6.7 Dissoluzione di HF-EC in diverse proporzioni in PBS a t.a.

	TEMPO ZERO	30 MINUTI	60 MINUTI	120 MINUTI	180 MINUTI	240 MINUTI	300 MINUTI
HF-EC 50-50							
HF-EC 70-30							
HF-EC 90-10							

Tabella 6.8 Dissoluzione di HF-FLUO in diversi mezzi di dissoluzione e temperature


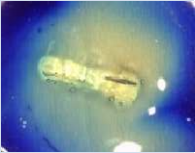
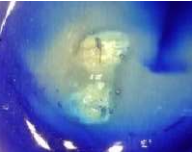
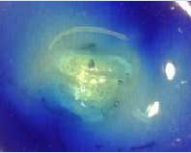
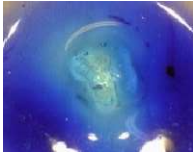
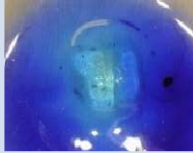
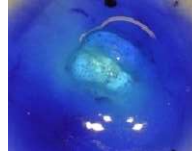















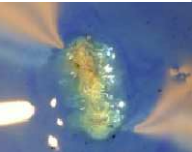
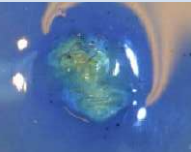
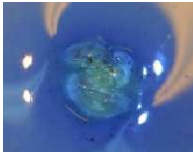
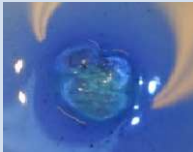
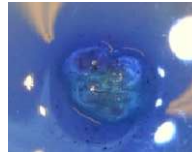


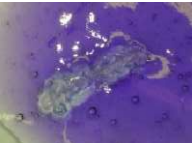

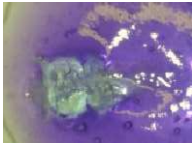



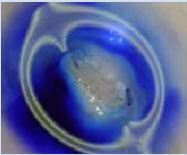
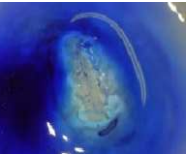
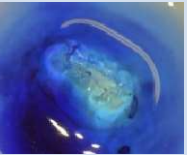
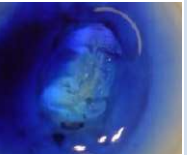
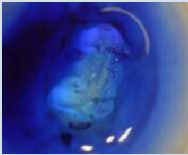
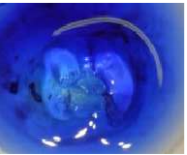





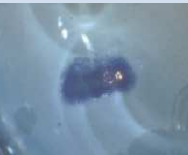



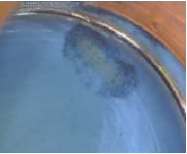

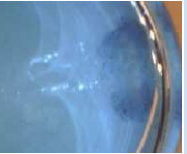
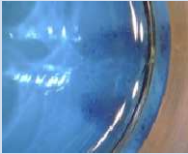
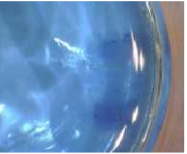






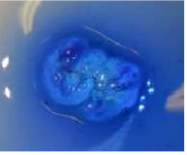
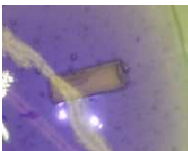

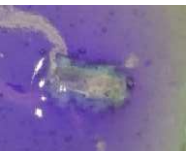



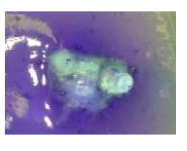
	TEMPO ZERO	30 MINUTI	60 MINUTI	120 MINUTI	180 MINUTI	240 MINUTI	300 MINUTI
VITREO t.a.							
PBS 37°C							
PBS 32°C							
PBS t.a.							
AGR-HA 4.1 t.a.							

Tabella 6.9 Dissoluzione di HF in diversi mezzi e temperature

	TEMPO ZERO	30 MINUTI	60 MINUTI	120 MINUTI	180 MINUTI	240 MINUTI	300 MINUTI
VITREO t.a.							
PBS 37°C							
PBS 32°C							
PBS t.a.							
AGR-HA 4.1 t.a.							

7.GRAFICI

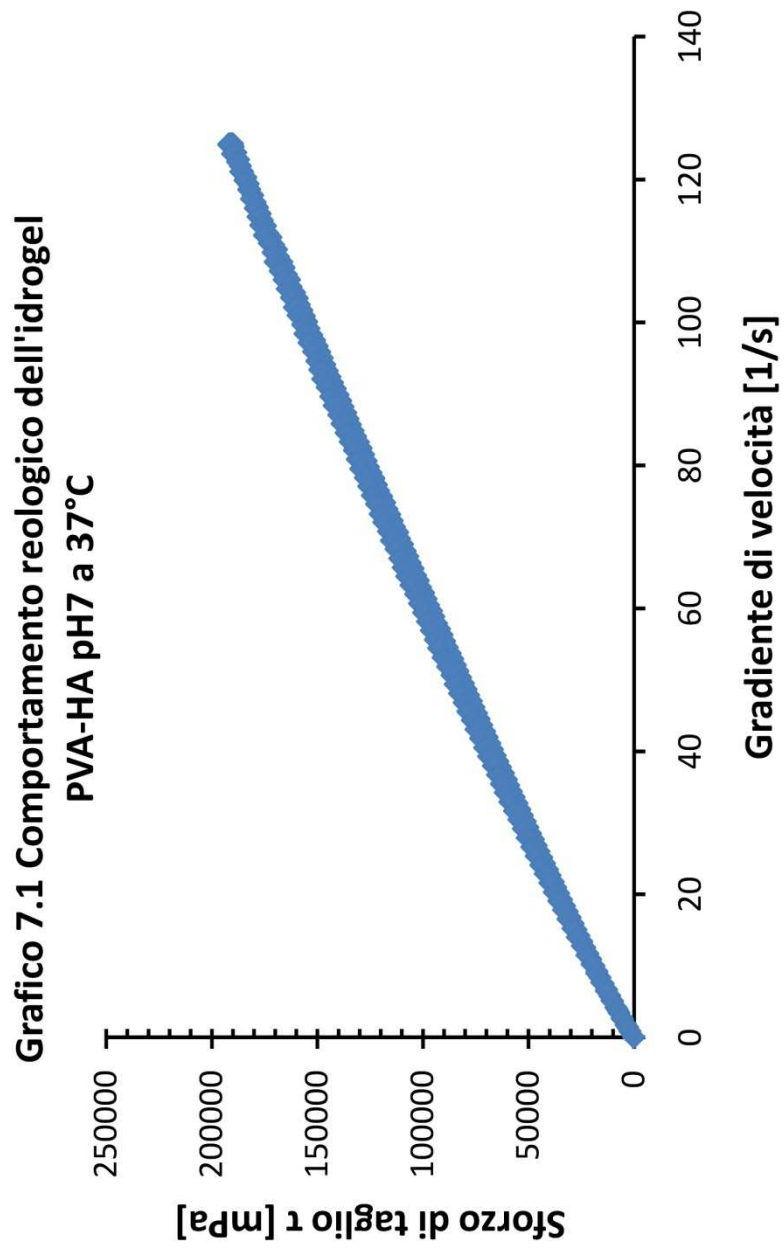
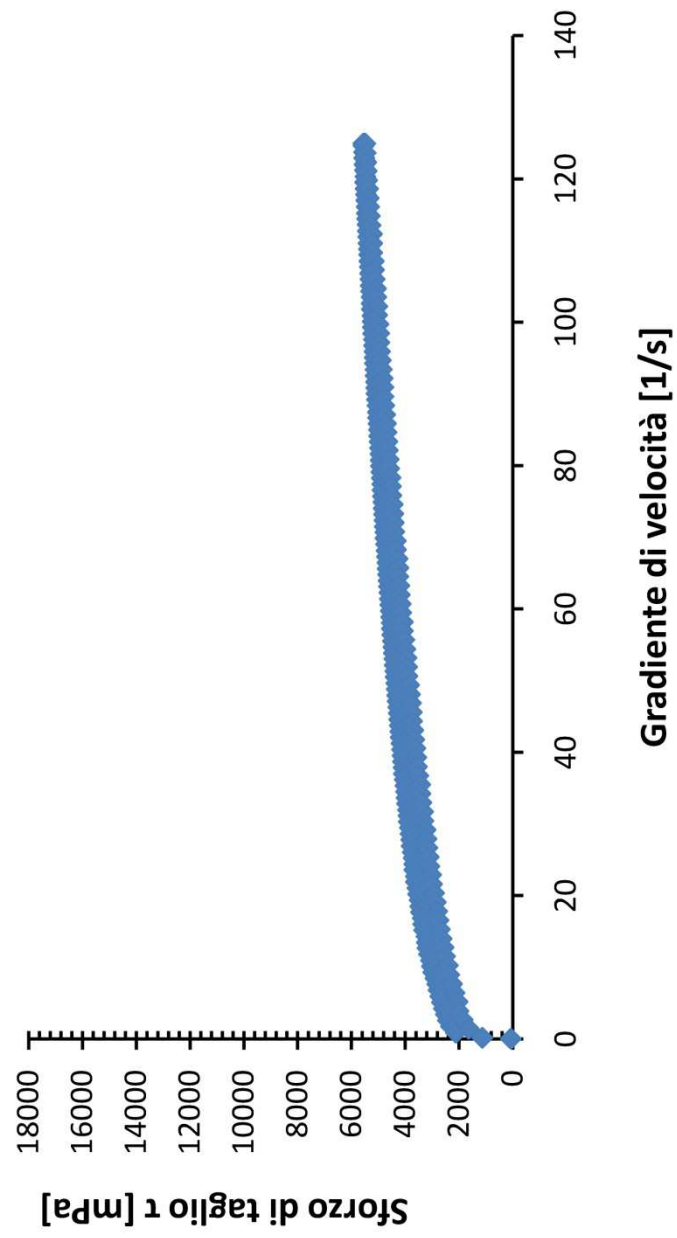
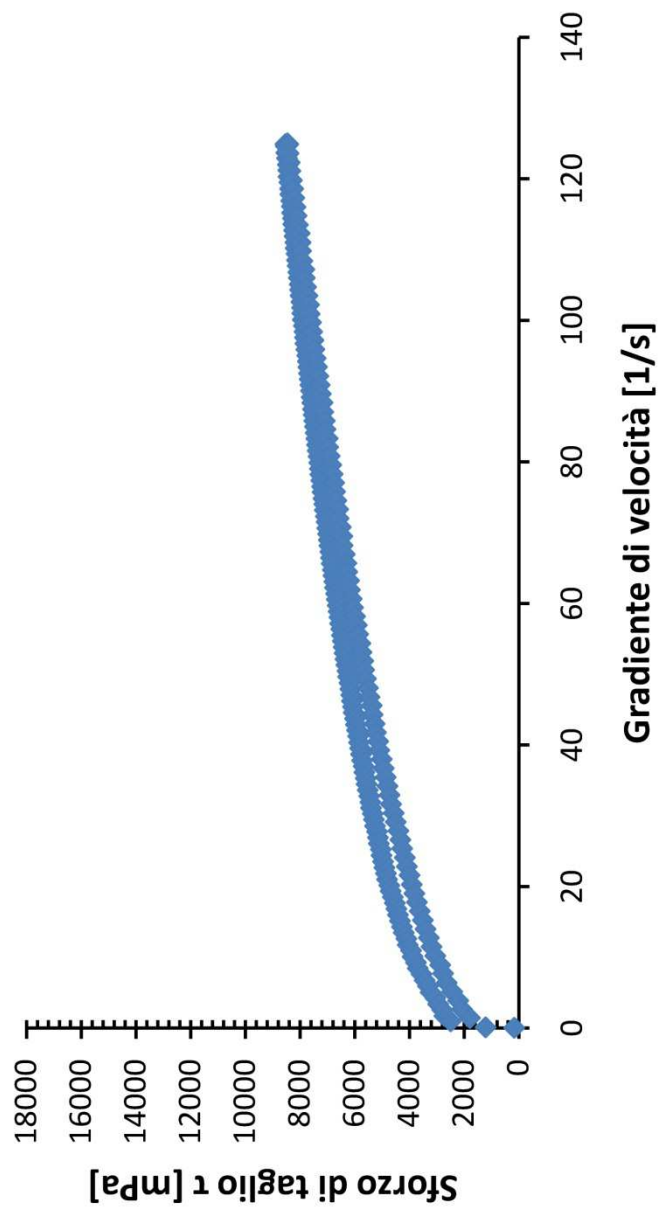


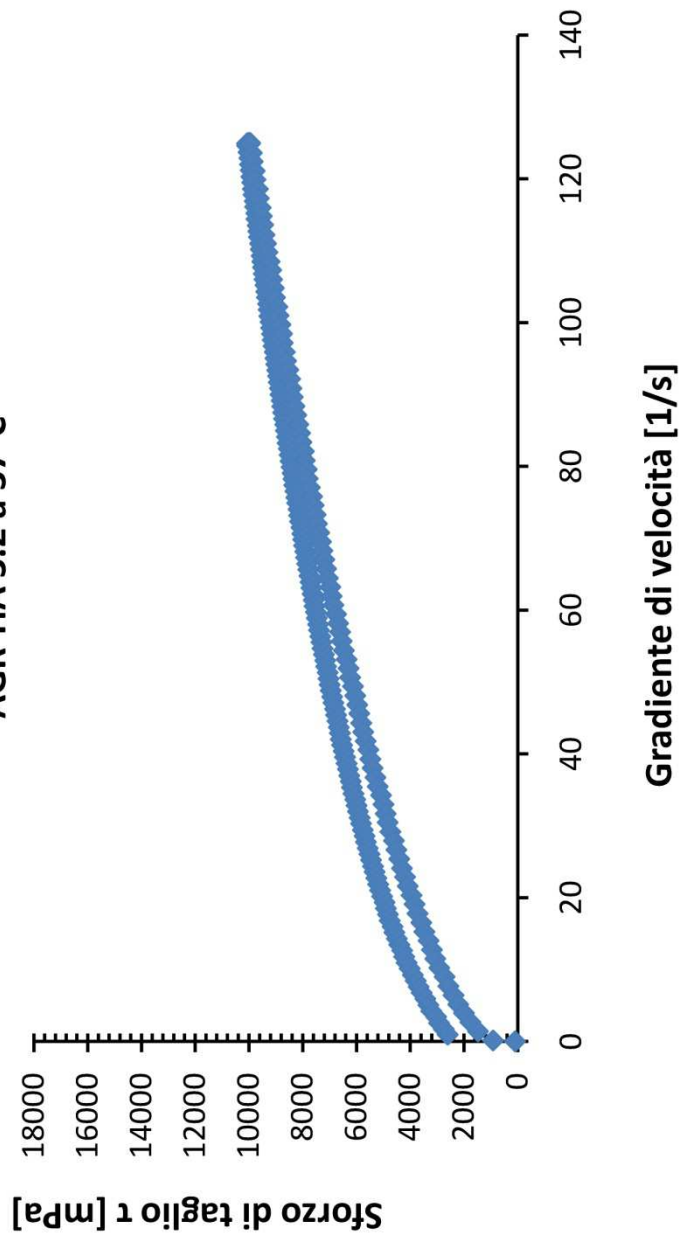
Grafico 7.2 Comportamento reologico dell'idrogel AGR-HA 3.0 a 37°C

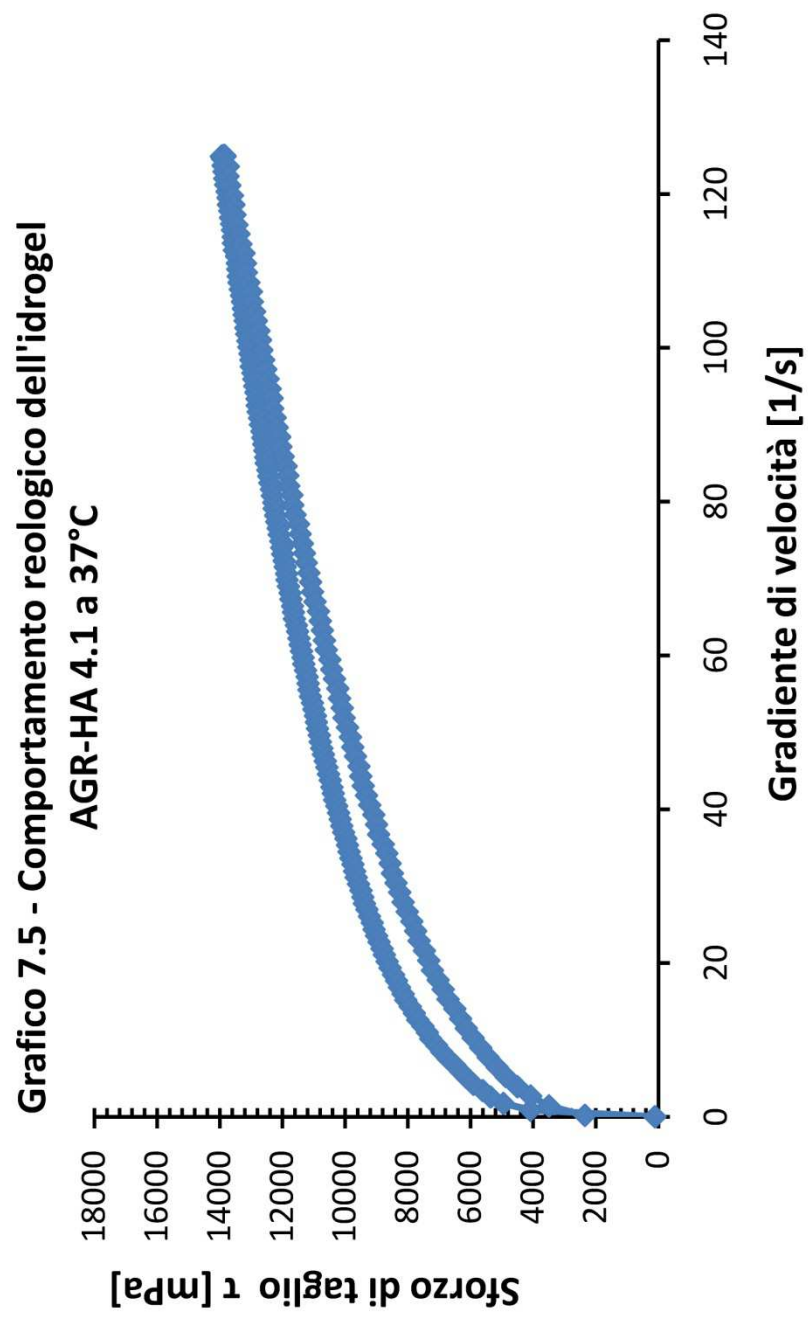


**Grafico 7.3 Comportamento reologico dell'idrogel
AGR-HA 3.1 a 37°C**



**Grafico 7.4 Comportamento reologico dell'idrogel
AGR-HA 3.2 a 37°C**





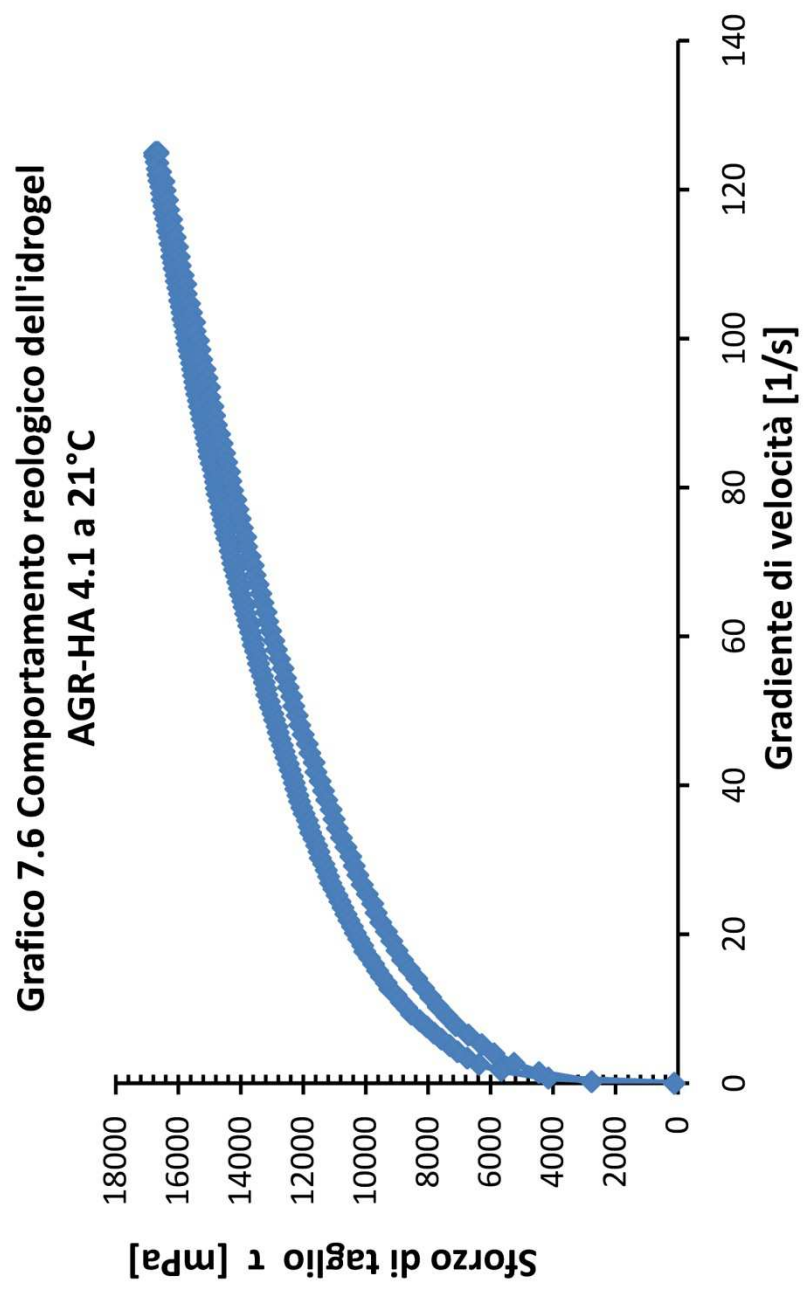


Grafico 7.7 Variazione dei moduli elastici in funzione dello strain con frequenza di oscillazione di 1 Hz per l'idrogel PVA-HA pH7 a 37°

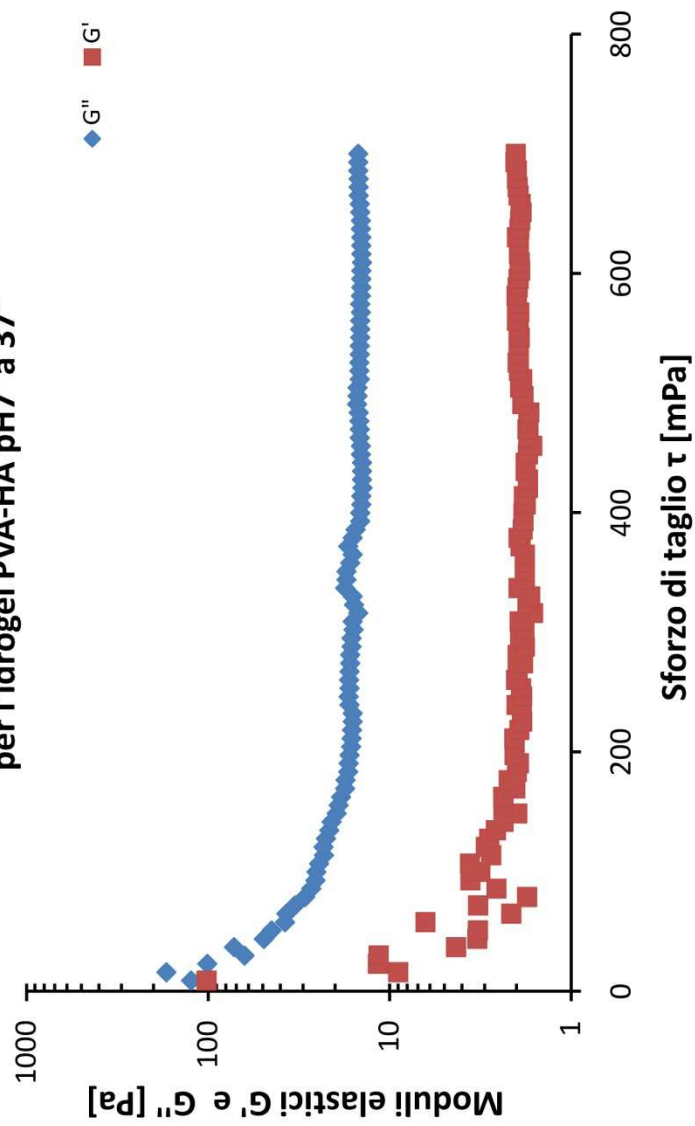
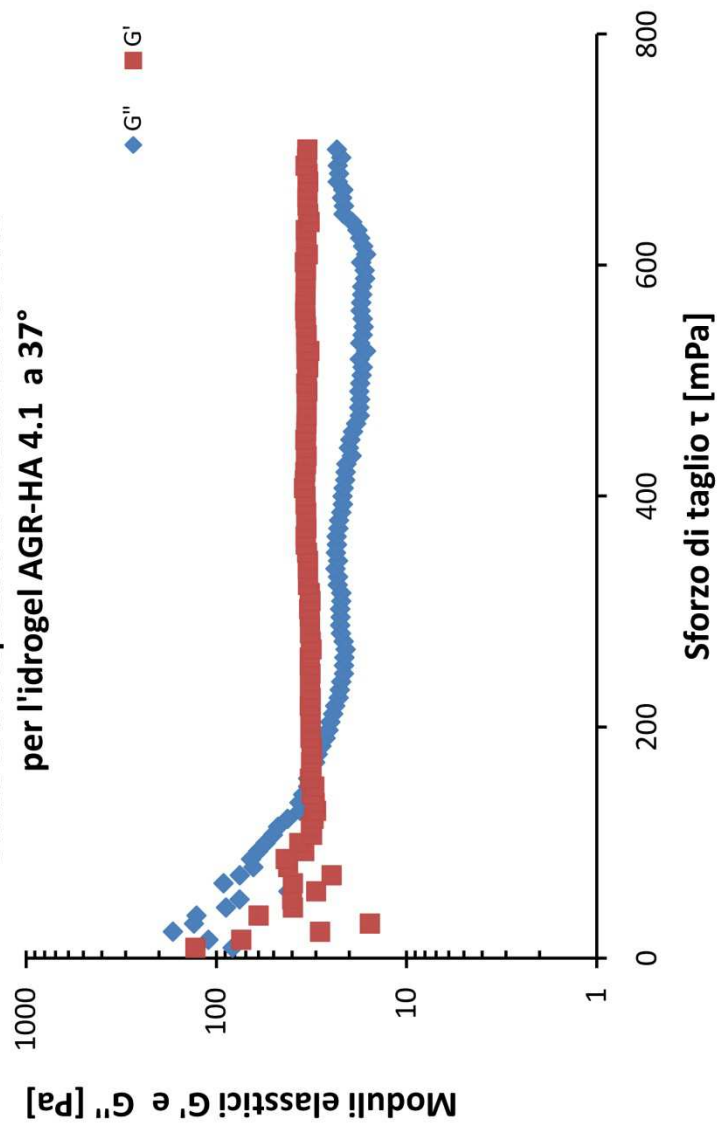


Grafico 7.8 Variazione dei moduli elastici in funzione dello strain con frequenza di oscillazione di 1 Hz per l'idrogel AGR-HA 4.1 a 37°



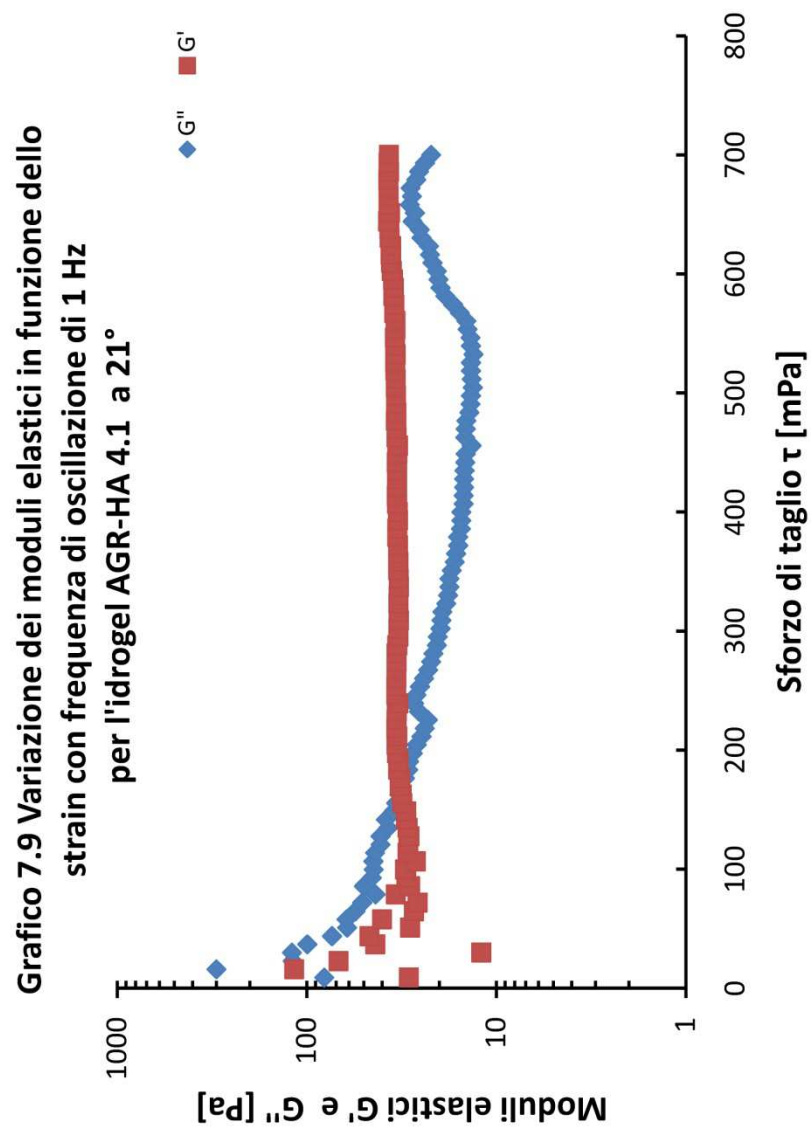


Grafico 7.10 Variazione dei moduli elastici in funzione della
frequenza, con sforzo di taglio costante ($\tau=510$ mPa), dell'idrogel
AGR-HA 4.1 a 37°C

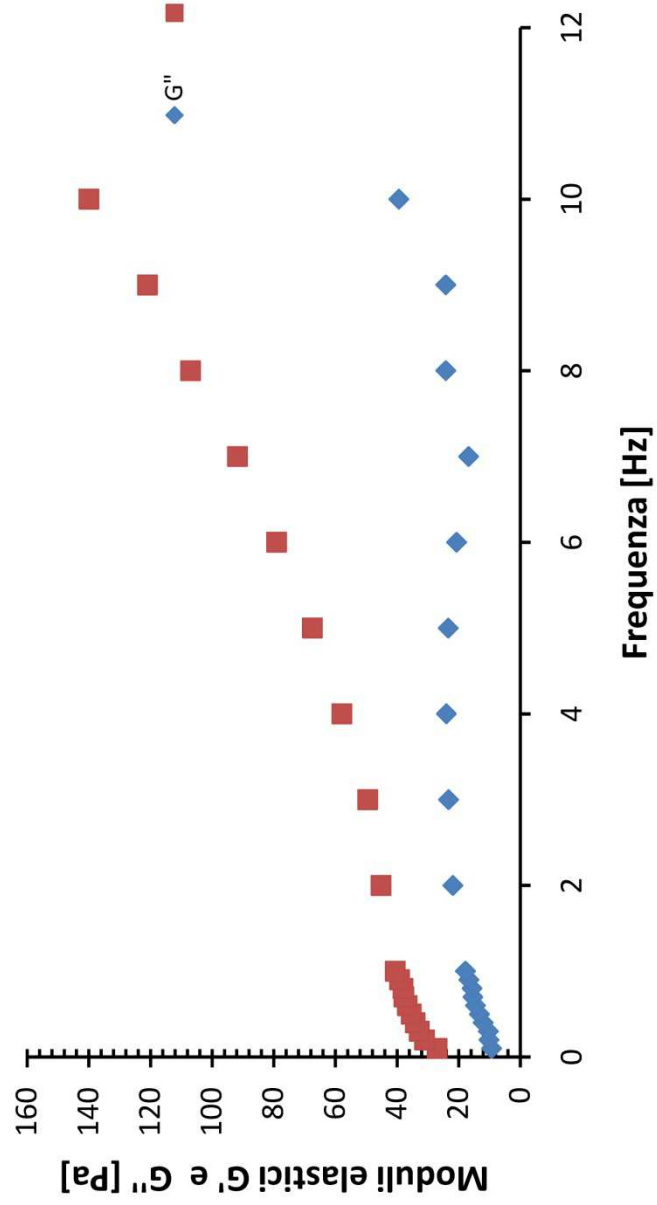


Grafico 7.11 Variazione dei moduli elastici in funzione della
frequenza, con sforzo di taglio costante ($\tau=510$ mPa), dell'idrogel
AGR-HA 4.1 a 21°C

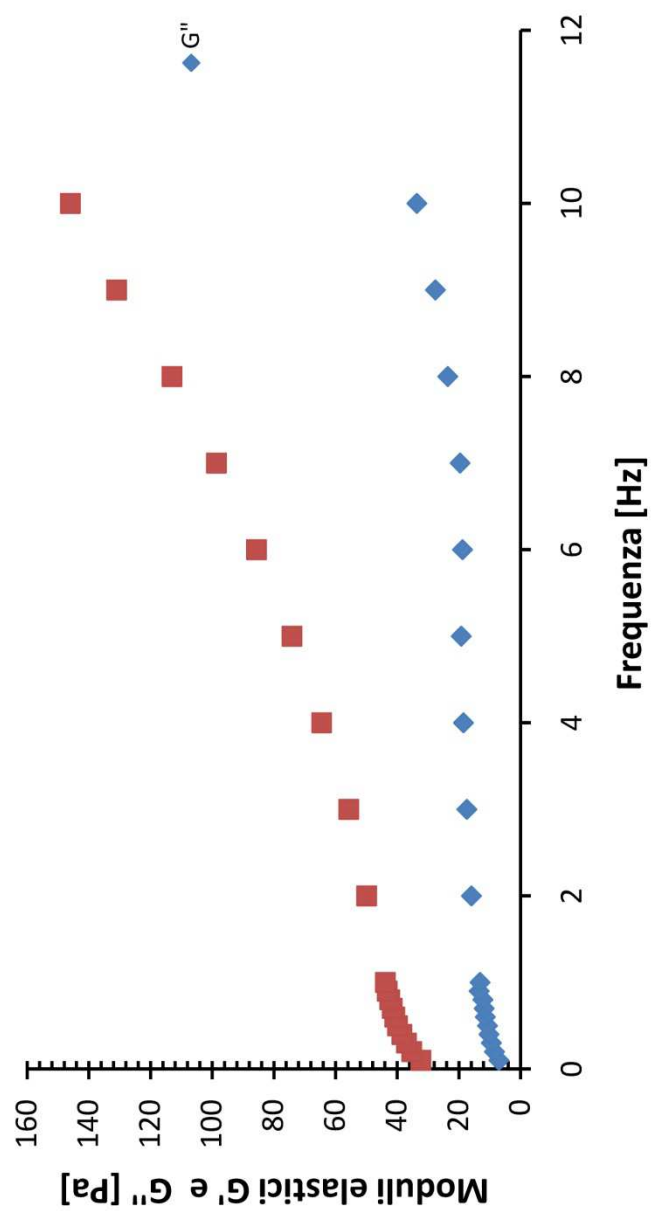


Grafico 7.12 Confronto fra le rette di taratura di Fluocinolone acetonide in PBS, in assenza di HPC e con due diverse concentrazioni di HPC

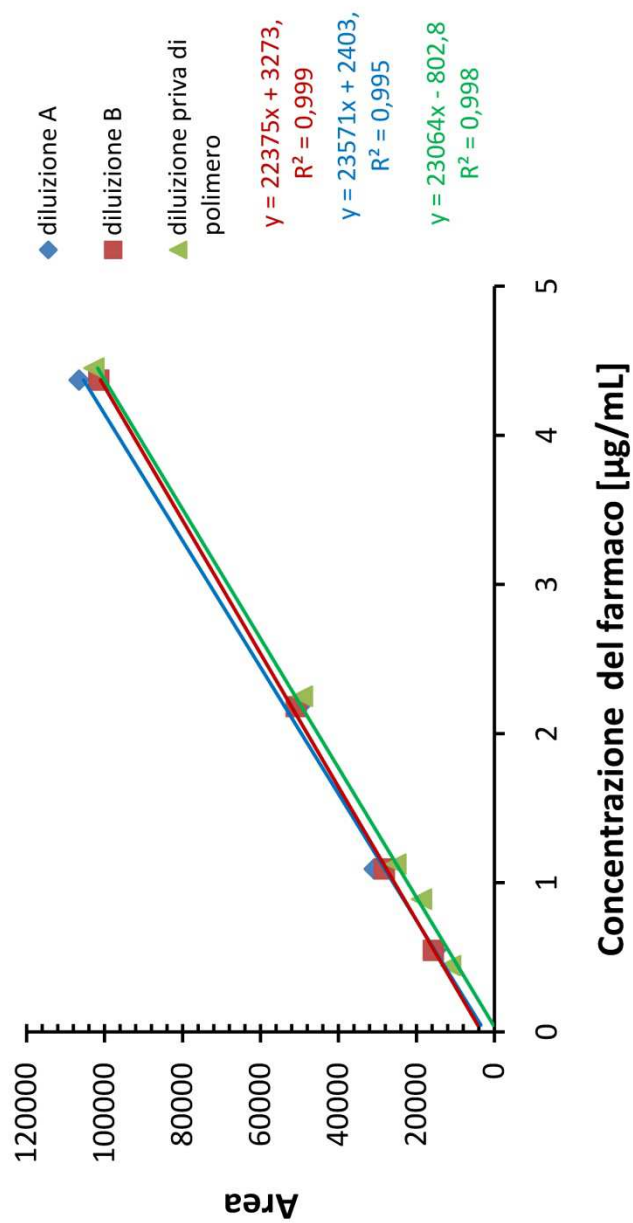
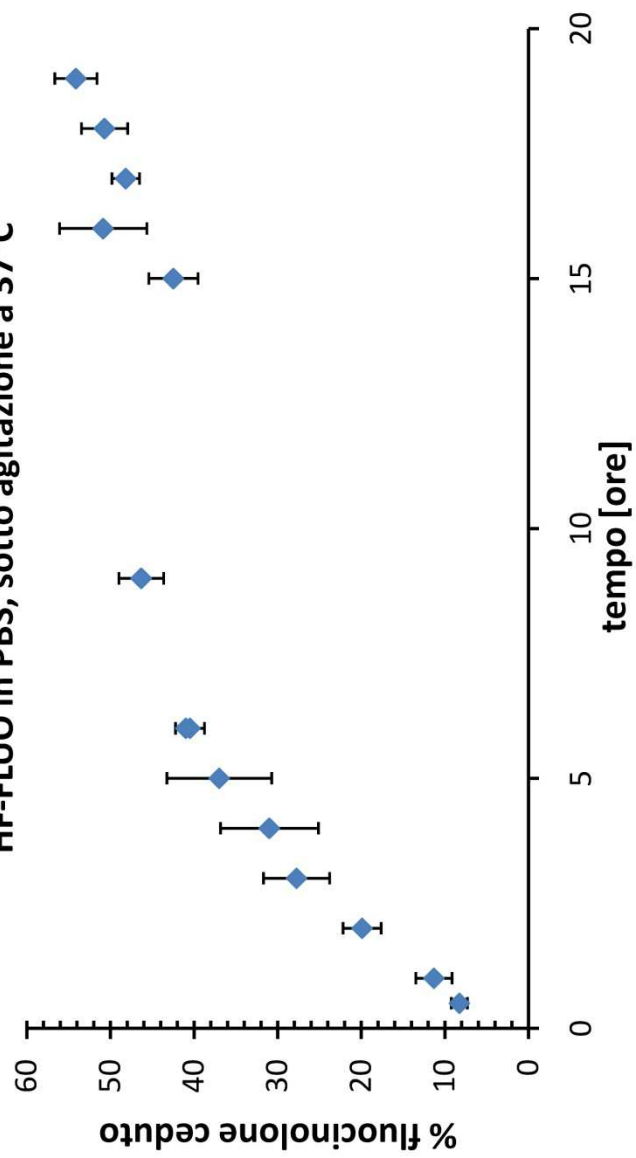
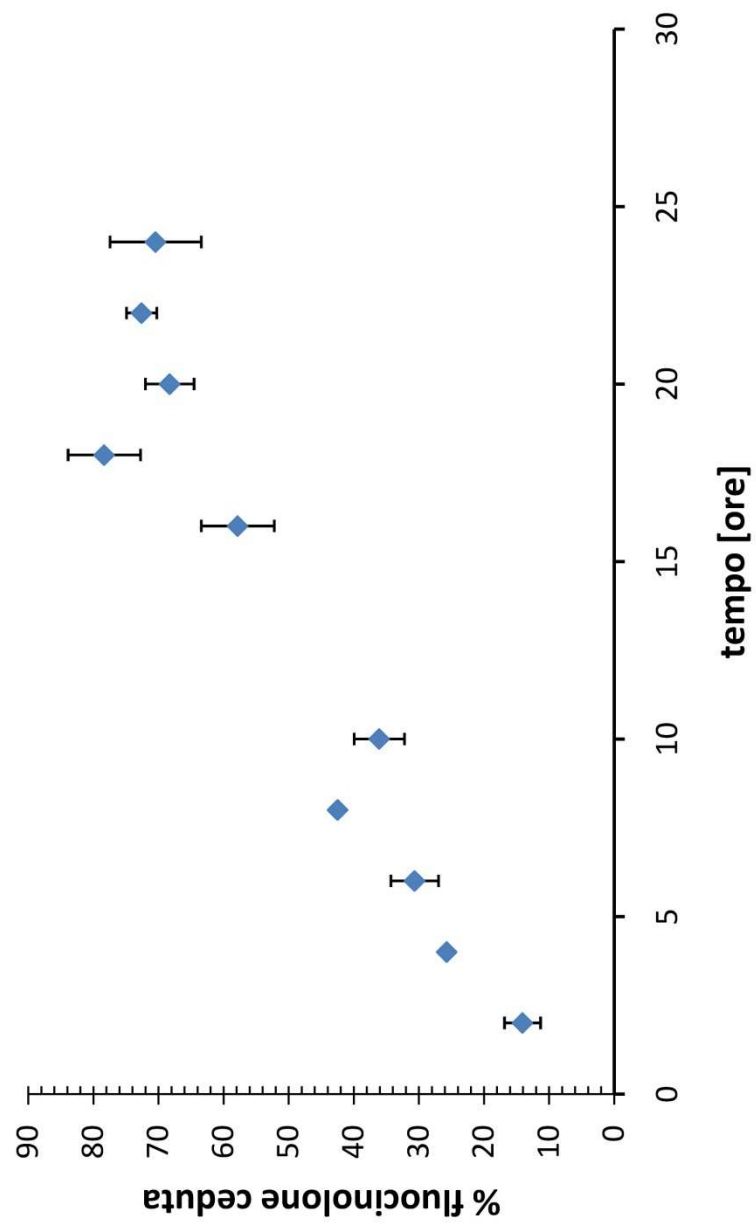


Grafico 7.13 Profilo di cessione del Fluocinolone acetoneide da HF-FLUO in PBS, sotto agitazione a 37°C



**Grafico 7.14 Cessione del fluocinolone acetoneide da HF-FLUO
in AGR-HA 4.1 a 37° C**



8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Albano, L. (2013). *Sviluppo e caratterizzazione tecnologica di preparati farmaceutici ad uso oftalmico topico e intravitreale*. Tesi di laurea, Pisa.

Artico, M., Castano, P., et Al., (2005). *Anatomia Umana Principi*. Edi.Ermes, Milano.

Baino, F. (2010). *Towards an ideal biomaterial for vitreous replacement: Historical overview and future trends*. Acta Biomaterialia, 921-925.

Bonfiglio, A. (2012). *Vitreous humor dynamics and characterization of mixing processes in the eye: three-dimensional and viscoelastic effects*. Tesi di dottorato, Genova.

Carbone, E., Aicardi, G., Cicirata, F. (2008). *Fisiologia dalle molecole ai sistemi integrati*. Edises, Napoli

Colombo, P., et Al (2004). *Principi di Tecnologie Farmaceutiche*. Casa Editrice Ambrosiana.

Friedrich, S., Cheng, Y.-L., & Saville, B. (1997). *Finite element modeling of drug distribution in the vitreous humor of rabbit eye*. Annals of Biomedical Engineering , 303-314.

Kakuji, T., & Isowaki, A. (2001). *Pharmacokinetic model for in vivo/in vitro correlation of intravitreal drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews , 17-24.

Katzung, B. (2009). *Farmacologia generale e clinica*. Piccin Nuova Libreria, Padova.

Kimura, H., Ogura, Y., Hashizoe, M., Nishiwaki, H., Honda, Y., Ikada, Y. (1994). *A new vitreal drug delivery system using an implantable biodegradable polymeric device*. Investigative ophthalmology and visual sciences, 2815-2819.

Kompella, U., & Edelhauser, H. (2011). *Drug product Development for the Back of the Eye*. New York: Springer.

Kummer, M., Abbott, J., Dinser, S., & Nelson, B. (2007, August). *Artificial vitreous humor for "in vitro" experiments*. 29 th Annual International Conference of the IEEE EMBS . Lyon, France: 6406-6409.

Leone, G., Al, &., Consumi, M., Aggravi, M., Donati, A., Lamponi, S., (2010). *PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous*. J Mater Sci: Mater Med 2010 , 2491-2500.

Loch, C., Bogdahn, M., et Al. (2013). *Simulating of drug distribution in the vitreous body after local drug application into intact vitreous body and in progress of posterior vitreous detachment*. Journal of Pharmaceutical Sciences .

Loch, C., Nagel, S., Guthoff, R., Seidlitz, A., & Weitschies, W. (2012). *The vitreous model- a new in vitro test method simulating the vitreous body*. Biomed Tech, 517-526.

Mullers, K., Wah, M., & Pinto, J. (2013). *Production of dosage forms for oral drug delivery by laminar extrusion of wet masses*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 626-632.

Necas, J., Bartosiakova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. Veterinarni Medicina , 397-411.

Nickerson, C., Park, J., Kornfield, J., & Karageozian, H. (2008). *Rheological properties of the vitreous and the role of hyaluronic acid*. Journal of Biomechanics, 1840-1846.

Swindle, K. E., & Ravi, N. (2007). *Recent advances in Polymeric vitreous substitutes*. Future drugs, 255-265.

SITI WEB

ec.europa.eu/health/documents/community-register/.../anx_2995_it.pdf. (s.d.).

<http://dctf.uniroma1.it/galenotech/>. (s.d.).

<http://iconbioscience.com/ibi-20089/>. (s.d.).

SOI. (s.d.). *L'occhio e la vista*. Tratto il giorno luglio 2014 da Società oftalmologica italiana.